

**Untersuchungen über die immunologische
Identität von Human-Leukämie-Lysozymen
und deren Bedeutung für die Diagnostik**

von

THOMAS LUDWIG HOFMANN

aus Nürnberg

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor Prof. Dr. W. Kersten

Untersuchungen über die immunologische
Identität von Human-Leukämie-Lysozymen
und deren Bedeutung für die Diagnostik

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Thomas Ludwig Hofmann
aus Nürnberg

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg

Dekan: Professor Dr. W. Kersten
Referent: Professor Dr. W. Kersten



Tag der mündlichen Prüfung: 03.06.1981

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Vorkommen und Verbreitung	3
1.2 Eigenschaften der Lysozyme	4
1.3 Bestimmungsmethoden für Lysozymaktivitäten	5
1.3.1 Indirekte Methoden	6
1.3.1.1 Photometrische Bestimmungen	6
1.3.1.2 Lysoplate-Verfahren	7
1.3.1.3 Lyso-Rocket-Elektrophorese	8
1.3.1.4 Nephelometrie-Verfahren	10
1.3.1.5 Bestimmung mit Membranelektroden	11
1.3.1.6 Fluoreszenz-Messung	11
1.3.1.7 Kolorimetrie	12
1.3.1.8 Elektronenresonanz Spektrometrie	12
1.3.2 Direkte Methoden	13
1.3.2.1 Rocket-Elektrophorese	13
1.3.2.2 Laser-Nephelometrie	14
1.3.2.3 Radioimmunassay	15
2. Problemstellung	19
3. Material und Methoden	20
3.1 Chemikalien und Geräte	20
3.2 Isolierung des Gesamteiweisses aus Urin von Patienten mit monocytärer Leukämie	21
3.3 Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose	21
3.4 Ionenaustauschchromatographie an Phospho-Cellulose	23
3.5 Ionenaustauschchromatographie an CM-Sephadex C-50	23
3.6 Proteinbestimmung durch UV-Absorption	24
3.7 Proteinbestimmung nach Lowry	25
3.8 Analytische Disk-Elektrophorese an Polyacrylamid-Zylindergelen	26

	Seite
3.9	Bestimmung der Lysozymaktivität
3.10	Immundiffusion nach Ouchterlony
3.11	Immunelektrophorese nach Grabar und Williams, Scheideggerelektrophorese
3.12	Konzentrieren von verdünnten Lösungen mit einer Amicon-Apparatur
4.	Ergebnisse
4.1	Isolierung der Gesamtproteine
4.2	Disk-Elektrophorese der Harne nach DEAE- Passage
4.2.1	Ermittlung der Lysozymaktivitäten in Beziehung zu den Proteinbanden
4.2.2	Lagerung der vorgereinigten Untersuchungs- lösungen
4.3	Ionenaustausch der Proteinlösung II an P-Cellulose
4.3.1	Disk-Elektrophorese der aktiven Fraktion 58 des P-Cellulose Laufs an Gelen unterschiedlicher Konzentrationen
4.3.2	Überladungselektrophorese
4.4	Wiederholter Austausch der lysozymaktiven Fraktionen an P-Cellulose
4.5	Ionenaustausch des Lysozyms aus Probe II an Sephadex C-50
4.6	Ouchterlony Doppel-Immundiffusion
4.7	Immunelektrophorese nach Scheidegger
4.8	Immunelektrophorese nach Grabar und Williams
5.	Diskussion
6.	Zusammenfassung
7.	Literaturverzeichnis

1. EINLEITUNG

=====

Von der Commission on Enzyme Nomenclature wurde 1964 für Lysozym die Klassifikationsbezeichnung E. C. 3.2.1.17 festgelegt.

Systematischer

Name: Mucopolysaccharid-N-Acetylmuramylhydrolase.

Trivialnamen: Mucopolysaccharidglucosaminidase, Lysozym, Muramidase.

Die Bezeichnung Lysozyme sollte nur Enzyme mit β -1,4-Glycanhydrolaseaktivität berücksichtigen.

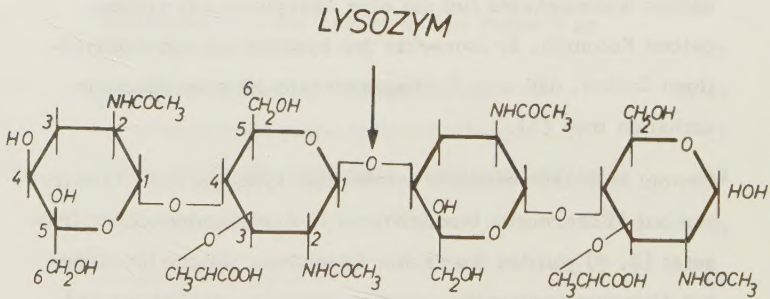
Die primäre Identifizierung eines Lysozyms wird normalerweise durch die lytische Aktivität gegenüber *Micrococcus lysodeikticus* (NCTC 2665) erbracht. Chitinasen haben keinen Effekt auf diese Mikroorganismen und sind daher ausgeschlossen.

Lysozym wurde 1922 von A. Fleming entdeckt. Ein Tropfen seines Nasensekrets fiel auf eine Agarplatte mit großen, gelben Kolonien. Er bemerkte den Lysehof und zog den richtigen Schluß, daß sein Nasensekret eine lytische Substanz enthalten muß (1).

Obwohl sehr früh entdeckt wurde, daß Lysozym beim Einwirken auf *Micrococcus lysodeikticus* N-Acetylaminosaccharose freisetzt (2, 3) wurden die ersten Anzeichen, welche Bindungen von Lysozym angegriffen werden, gemacht, als Berger und Weiser (4) zeigten, daß Lysozym Chitin abbaut. Chitin ist ein Linearpolymer aus N-Acetylglucosamin $\text{GlcNAc-}\beta\text{-(1}\rightarrow\text{4)-GlcNAc-}\beta\text{-(1}\rightarrow\text{4)}_n$.

Es handelt sich bei Lysozym demnach um eine β -(1 $\rightarrow$ 4)Glucosaminidase. 1959 isolierten Salton und Ghuysen (5) aus

Lysozym-Spaltprodukten von *Micorcccoccus lysodeikticus*-Zellwänden ein Tetrasaccharid, das aus gleichen Teilen N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure bestand. Die Inkubation des Tetrasaccharids mit Lysozym erbrachte als einzige Produkte Disaccharide aus GlcNAc und MurNAC. Dadurch erhielt man Aufschluß über den Zellwandaufbau, da angenommen werden mußte, daß die Disaccharide durch eine lysozymsensitive β -(1 $\rightarrow$ 4)-Bindung verknüpft sein mußten. Der endgültige Beweis über die spezifischen Angriffspunkte wurde durch Kernresonanzspektren erbracht. Demnach spaltet Lysozym β -(1 $\rightarrow$ 4)-Bindungen zwischen N-Acetylmuraminsäure und N-Acetylglucosamin (6).

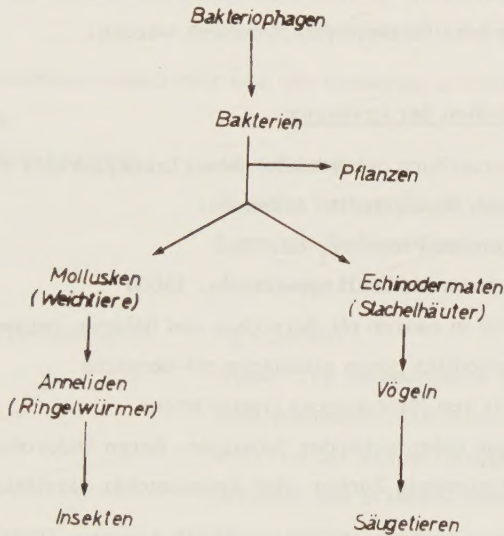


1.1

Vorkommen und Verbreitung

Lysozym kommt praktisch ubiquitär vor, wie es bereits Fleming erkannt hatte (1).

Lysozym konnte nachgewiesen werden in:



Verteilung im menschlichen Organismus:

Gewebe	Lysozym	Lokalisierung
Knorpel	+	extracellulär
Dünndarm	+	Paneth-Zellen
Leber	++	Kupffersche Sternzellen
Niere	+++	proximale Tubuluszellen
Tränendrüse	+++	
Speicheldrüse	+	serösen Zellen
Milchdrüse	+	
Lymphknoten	++	Histiocyten
Milz	+	Histiocyten
Blut	+++	Granulocyten, Monocyten
Granulationsgewebe	+	Histiocyten
Lunge	+	Pneumocyten

Kein Lysozym konnte nachgewiesen werden im Urin gesunder Personen, in Lymphocyten, Plasmazellen, eosinophilen Granulocyten, basophilen Granulocyten, Thrombocyten (8, 9, 10).

Der Nachweis in den Zellen kann mit Immunfluoreszenzmethoden, z. B. der Immunglobulin-Peroxidase-Brückemethode oder bakteriolytisch geführt werden.

1.2 Eigenschaften der Lysozyme

Die Untersuchung der verschiedenen Lysozyme läßt charakteristische Eigenschaften erkennen:

1. Basisches Protein p_I ca. 10,5
2. Niederes Molekulargewicht ca. 15000
3. Stabil in sauren pH-Bereichen und höheren Temperaturen
4. Empfindlich gegen alkalische pH-Bereiche
5. Lysis von *Micrococcus lysodeikticus*
6. Abbau entsprechender Substrate, deren Endprodukte reduzierende Zucker oder Aminozucker darstellen.

Die Primärstruktur von Hühnereiweiß-Lysozym (HEW-LZM) wurde 1963 aufgeklärt (11), die Primärstruktur von Human-Leukämie-LZM 1971 (12).

Hinsichtlich ihrer Eigenschaften werden 3 Hauptgruppen von Lysozymen unterschieden. Bietet man verschiedenen Lysozymen ein lineares Peptidoglycan zur Verdauung an, so entstehen gemäß den einzelnen Enzymen unterschiedliche Hauptprodukte.

Hühnereiweiß-LZM und Human-Leukämie-LZM convertieren das Peptidoglycan hauptsächlich in:

ein Disaccharid $\text{GlcNAc-}\beta\text{-(1}\rightarrow\text{4)-MurNAc}$

ein Tetrasaccharid $(\text{GlcNAc-}\beta\text{-(1}\rightarrow\text{4)-MurNAc})_2$ und

ein Disaccharidhexapeptid

$\text{GlcNAc-}\beta\text{-(1}\rightarrow\text{4)-MurNAc}$

$\text{L-Ala-D-isoGlu-(Gly)-L-Lys-D-Ala-D-Ala}$

Dementsprechend teilt man die Lysozyme in drei Klassen ein:

c-Typ-Lysozym: (c = chicken)

In diese Gruppe fallen Hühnereiweiß-Lysozym ähnliche Enzyme, unter anderem das Human-Leukämie-LZM.

g-Typ-Lysozym: (g = goose)

Dieser Typ ist besonders in Vögeln weit verbreitet. Sie unterscheiden sich von der ersten Gruppe in ihrer Struktur und in ihrem immunologischen Eigenschaften.

Alle Lysozyme, die sich nicht in diese Gruppen einordnen lassen, werden in der dritten Gruppe zusammengefaßt, z. B. T4-Phagen-, Papaya-Lysozym (13).

1.3

Bestimmungsmethoden für Lysozymaktivitäten

Die Lysozymaktivitätsmessungen sind generell in zwei Gruppen zu unterteilen:

1. die indirekten Methoden, beruhend auf der enzymatischen Aktivität des Lysozyms,
2. immunologische Messungen mit spezifischen Antisera.

1.3.1 Indirekte Methoden

1.3.1.1 Photometrische Bestimmungen:

Eine der ersten optischen Methoden wurde von Boasson entwickelt (21). Es handelt sich um Messung des Extinktionsabfalls einer *Micrococcus lysodeikticus*-Suspension nach Lysozymzusatz bei einer Inkubationszeit von 60 Minuten. Die Aktivität wird entweder auf kristallines Hühnereiweiß-Lysozym oder gereinigtes Human-Leukämie-Lysozym bezogen.

Eine Verbesserung der Ergebnisse wurde erreicht, als von der Dead-Stop-Methode auf die Messung der Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion übergegangen wurde (22, 23, 24). Durch Registrierung der Anfangsgeschwindigkeit fällt der Fehler, der durch Inhibierung des Enzyms durch seine Endprodukte entsteht, fort (25). Weitere Fehlermöglichkeiten der indirekten photometrischen Bestimmung sind Bestandteile der Proben, die mit der bakteriolytischen Wirkung von Lysozym interferieren. In vitro hemmen Substanzen wie Heparin, Hyaluronsäure, DNA, RNA und Amino-glykoside (Streptomycin, Gentamycin) die Enzymwirkung (26, 27, 28). Verbindungen wie Histone und Protamine erhöhen die Aktivität (26, 27).

Bei Untersuchung der Wiederfindungsquote wird den Proben 5 µg Human-Leukämie-Lysozym zugesetzt. Die mittlere Wiederfindungsquote in Seren gesunder Personen war 101% - 119%. Im Urin lag sie zwischen 88% und 150% (29). Die Variation der Wiederfindung ist zwischen verschiedenen Patienten größer als bei einem Patienten. Es ist anzunehmen, daß die unterschiedlichen Ergebnisse auf die An- bzw. Abwesenheit von Aktivatoren und Inhibitoren zurück-

zuführen ist. Die bakteriolytische, spektrophotometrische Bestimmung ist durch diese Faktoren mit Fehlerquoten bis zu 35% behaftet. Der Anwendungsbereich liegt bei ca. 0,1 - 10 µg Lysozym pro Testansatz (29).

1.3.1.2 Lysoplate-Verfahren:

Das Lysoplate-Verfahren wurde von Osserman und Lawler entwickelt (14). Diese Methode sollte bessere Ergebnisse über einen weiten Konzentrationsbereich bringen. Lysozym diffundiert in ein *Micrococcus lysodeikticus* enthaltendes Agargel, die Durchmesser der entstehenden Lysehöfe sind proportional der Lysozymkonzentration. Die Bestimmung wird beeinflusst durch eine Anzahl Parameter von seiten des Gelmediums: mit steigendem pH steigt der Durchmesser der Lysezonen, ebenso mit steigender Temperatur.

Im Gegensatz zur photometrischen Bestimmung steigt bei einer Temperaturerhöhung von 4° auf 40° die Aktivität bei der Lysoplate-Methode nur um das 3-fache gegenüber das 40-fache bei der photometrischen Methode (30). Eine erhöhte *Micrococcus*konzentration im Gel erbringt kleinere Lysehöfe. Wie bei den photometrischen Methoden ist der Einfluß der Probenzusammensetzung auch hier erheblich. Setzt man dem Ansatz Rinderserumalbumin zu, so findet man bei Vergleich mit einer Eichkurve, die ohne Rinderserumalbumin aufgenommen wurde, nur 50% des tatsächlichen Gehaltes (30). Es ist festgestellt worden, daß im Serum Lysozym zu einem großen Teil an Proteinen gebunden ist, hauptsächlich an γ -Globuline und α_2 -Globuline. Derartige Lysozym-Proteinkomplexe haben notwendigerweise andere Diffusionseigenschaften im Lysoplate-Test. Da in vielen pathologischen Zuständen die Serumprotein-

zusammensetzung verändert ist, kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Ergebnisse dadurch beeinflußt werden. Greenwald und Moy (32) untersuchten die Variabilität der Lysoplate-Methode unter dem Aspekt der Verwendung verschiedener Agarosespezialitäten von verschiedenen Herstellern. Bei der Aufnahme von Eichkurven mit 10 verschiedenen Agarosen erhielt man 6 unterschiedliche Eichgerade. Agarplatten, die zusammen präpariert worden sind, zeigten eine sehr gute Übereinstimmung. Platten mit gleicher Agarose, aber zu verschiedener Zeit präpariert, brachten abweichende Ergebnisse. Selbst bei unterschiedlich langer Lagerzeit von Platten einer Charge traten Abweichungen der Standardkurven auf.

Lysozym ist ein hochkationisches Protein mit einem p_I ca. 10,5, beruhend auf hohen Anteilen an Lysin und Arginin im Molekül. Agarose enthält stark unterschiedliche Mengen an Sulfat- und Carboxylanionen. Durch die elektromagnetischen Wechselwirkungen wird die Diffusion des Lysozyms in Agarosen mit niederen Sulfatanteilen stark erleichtert. Die Durchführung des Tests beansprucht etwa 8 - 10 h, ein Vorteil ist der minimale apparative Aufwand. Die Sensitivität liegt bei ca. 1 $\mu\text{g/ml}$ Lysozym.

1.3.1.3 Lyso-Rocket-Elektrophorese:

Die Elektrophorese von Lysozym in *Micrococcus lysodeikticus*-Gel verursacht Lyse der Microorganismen. Dadurch wird die quantitative Bestimmung möglich (35). Das Prinzip ähnelt der "Rocket"-Elektrophorese von Laurell (33), anstelle der Antikörper wird hier die Agarose mit *Micrococcus lysodeikticus* versetzt. Analog der Antigen

Antikörper Crossed-Elektrophorese (34) kommt man dann zu "Crossed-Lyso-Elektrophorese" für analytische Zwecke: der elektrophoretischen Charakterisierung.

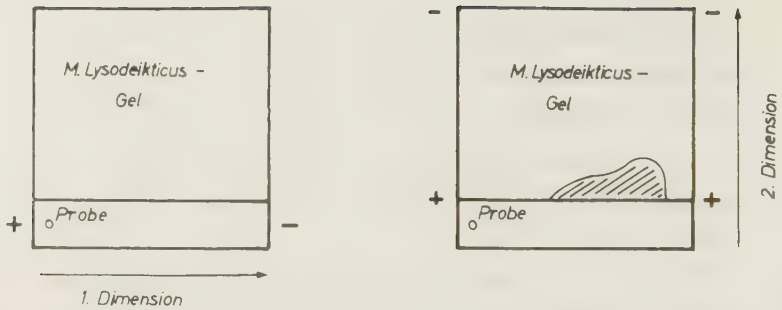
Die direkte Elektrophorese in *Micrococcus lysodeikticus*-Gel ergibt zigarrenförmige Gipfel, deren Länge innerhalb gegebener Grenzen linearproportional der Lysozymkonzentration ist.

Durch das Lyso-Rocket-Verfahren kann der Zeitaufwand gegenüber der Lysoplate-Methode reduziert werden. Allerdings ergaben sich Probleme durch die stark reduzierte Mobilität des Lysozyms infolge Verdünnens (35). Bei der Bestimmung muß daher die Erstellung der Standardkurve dem erwarteten Konzentrationsbereich der zu untersuchenden Probe angepaßt werden.

Zur Abklärung der Mobilitätsunterschiede von Lysozymverdünnungsreihen wurde gereinigtes Lysozym aus Monocytenleukämieurin einer Crossed-Lyso-Elektrophorese unterzogen. Daraus ergab sich, daß das Urin-Lysozym nicht homogen ist. Mindestens zwei sich teilweise überlappende Aktivitätspeaks sind im *Micrococcus lysodeikticus*-Gel feststellbar (35).

Diese Heterogenität von Urin-Lysozym konnte nur im Urin, nicht jedoch im Serum festgestellt werden.

Die Heterogenität in der Elektrophorese ist nicht durch Polymerisierung des Enzyms oder Verunreinigung hervorgerufen, wie durch Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese ausgeschlossen werden konnte. Die Bildung schwacher Aggregate (36) oder die Existenz von Isoenzymen (37) kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.



"Crossed-Lyso-Elektrophorese"

von Human Lysozyme aus Urin eines Monocyten-Leukämie-Patienten.

1.3.1.4 Nephelometrie-Verfahren:

In letzter Zeit wurden Bestimmungsverfahren entwickelt, deren Prinzip zwar auch die bakteriolytische Aktivität des Lysozyms ausnützt, aber mit verbesserten Meßmethoden arbeitet. Ein nephelometrischer Test (38) mißt z. B. die Verminderung des Tyndall-Streulichts nach Inkubation einer *Micrococcus lysodeikticus* Suspension mit Lysozym. Der Streulichtabfall korreliert mit der Lysozymkonzentration. Änderungen der Bilirubin- und Hämoglobinkonzentrationen, wie sie im Serum oft vorkommen, haben keinen Einfluß auf das Ergebnis. Man benötigt ca. 50 µl Serum oder Urin. Die untere Bestimmungsgrenze liegt bei 0,1 µg/ml Lysozym.

1.3.1.5 Bestimmung mit Membranelektroden:

Ein Verfahren von D' Orazio et al. (39) mißt die Freisetzung von Trimethylammoniumionen (TMPA^+) aus *Micrococcus lysodeikticus* durch Lysozym. Die TMPA^+ -Ionen werden mit einer entsprechend sensitiven Elektrode gemessen. Ihre Menge ist proportional der Lysozymaktivität.

TMPA^+ wird von lebenden *Micrococcus*-Zellen inkorporiert. Durch Lysozymaktivität wird die Zellwand zerstört, die Zellen platzen und geben das aufgenommene TMPA^+ wieder frei. In der Lösung verursacht nur freies TMPA^+ Potentialänderungen an der Elektrode. Die Potentialänderung ist proportional der Lysozymaktivität.

Die Methode ist stark abhängig von der Menge des aufgenommenen TMPA^+ der Zellen. Für jede neue Charge präparierter Mikroorganismen muß daher eine neue Standardkurve erstellt werden:

Potentialabfall pro Minute über μg Lysozym/ml.

Die untersuchten Serumproben zeigen mit der Literatur vergleichbare Ergebnisse, Serumbestandteile interferieren nicht mit der Meßkette.

1.3.1.6 Fluoreszenz-Messung:

Dieser Assay von Mintz et al. (40) verwendet *Bacillus subtilis* als Substrat. Die Zellwände der Mikroorganismen werden mit Fluorescamin (4-phenylspiro [furan-2 (3H) 1'-phtalan]-3,3'dion) markiert, das ein spezifisches fluoreszierendes Agens für die Bestimmung primärer Amine ist. Durch die Freisetzung von markierten fluoreszenzaktiven Fragmenten aus der Zellwand durch Lysozym steigt die Fluoreszenz der Testlösungen. Durch

eine Standardkurve wird der Lysozymgehalt ermittelt. Diese Methode ist nicht auf Lysozym beschränkt. Die Bestimmungsgrenze liegt bei 1 µg HEW-Lysozym. Es ist jedoch nicht geklärt, ob die Substitution mit Fluorescamin das Enzym inhibiert oder modifiziert. Das Verfahren ist sehr arbeitsaufwendig.

1.3.1.7 Kolorimetrie:

Alle Bestimmungsmethoden, die auf der bakteriolytischen Aktivität des Lysozyms beruhen, ermangeln eines definierten Substrates. Sowohl die Zuchtbedingungen für die *Micrococcus lysodeikticus*-Zellen, als auch die verschiedenen Präparationen der Zellwände haben Effekte auf die Lysozymaktivität.

Eine Modifikation der Methode nach Otaki und Kimura (41) benutzt als chemisch definiertes Substrat Dinitrophenyltetra-N-acetyl-β-chitotetraosid (42). Lysozym spaltet die Verbindung und setzt 3,4-Dinitrophenol frei, dessen Absorption bei 400 nm spektrophotometrisch registriert wird. Theoretisch wäre dieser Test am zufriedenstellendsten, da er ein reines Substrat verwendet. Allerdings ist die Empfindlichkeit mit ca. 100 µg Lysozym/ml extrem niedrig, so daß er für Serumuntersuchungen nicht in Frage kommt.

1.3.1.8 Elektronenresonanz Spektrometrie:

Johnston und Neuhaus veröffentlichten ein Verfahren, das auf der enzymatischen Hydrolyse von spinmarkierten Peptidoglycan basiert (43). In deren Untersuchung wird lineares unverzweigtes spinmarkiertes Peptidoglycan als Substrat für Lysozym gebraucht. Dadurch werden einige

Schwierigkeiten, die bei den komplexen Substraten wie Zellwänden auftauchen, umgangen. Spinmarkiertes Peptidoglycan ist ein einheitlich markiertes Polynitroxid. Hydrolyse dieses Glycans verursacht eine Schärfung des Elektronenresonanzspektrums.

Die Vorteile der Methode sind:

- a) optisch trübe Lösungen können untersucht werden,
- b) einfache und schnelle Durchführung,
- c) hohe Empfindlichkeit (0,15 µg/ml Lysozym).

1.3.2 Direkte Methoden

Die direkten Methoden arbeiten auf immunologischer Basis. Zur Durchführung sind immer spezieis spezifische Antikörper notwendig. Der Vorteil beruht auf der unmittelbaren Erfassung des Gehaltes an Enzym. Der Anfällige Umweg über die Aktivität, wie er in den bakteriolytischen Methoden gemacht wird, wird dabei umgangen.

Als Bezugssubstanz kann kein Hühnereiweiß-Lysozym verwendet werden, da dieses mit Anti-Human-Lysozym nicht kreuzreagiert.

1.3.2.1 Rocket-Elektrophorese:

1971 beschrieben Johannson und Malmquist (44) ein Verfahren, das auf elektrophoretischer Wanderung von Lysozym in ein spezifisches Antikörper enthaltendes Gel beruht. Die Länge der raketenförmigen Peaks korreliert mit der Lysozymkonzentration. Die Präzipitationsbanden müssen zur Sichtbarmachung mit Coomassie-Blue gefärbt werden.

Als Standard wird hochreines, aus Leukämieurinen isoliertes Human-Lysozym benutzt. Die Konzentration der Standardlösung wird durch Absorptionsmessung bei 280 nm bestimmt (45). Bei pH 7 hat eine Lösung von 1 mg/ml einen spezifischen Extinktionskoeffizienten von 2.55.

Die Nachteile des Verfahrens liegen in der niederen Empfindlichkeit gegenüber z. B. der Lysoplatemethode und den bereits erwähnten reduzierten elektrischen Mobilitätsverhalten von verdünnten Lysozymlösungen, welches zu unbeeinflussbaren Fehlern führt.

1.3.2.2 Laser-Nephelometrie:

Die Laser-Nephelometrie (46) mißt die Lichtstreuung, die durch die Immunpräzipitate hervorgerufen wird, wenn lysozymhaltige Lösungen mit spezifischem Antiserum versetzt werden.

Im Laser-Nephelometer wird gegenüber der einfachen Nephelometrie durch das Laser-optische System die Detektion des Streulichts der Antigen-Antikörper-Komplexe erheblich verbessert. Die Resultate korrelieren sehr gut mit der Lysoplatemethode ($r = 0,97$). Die Empfindlichkeit ist etwas besser als bei der Lysoplatemethode und beträchtlich besser als bei der Rocket-Immunelektrophorese. Die Methode ist in automatischen Analysengeräten durchführbar. Der Nachteil der Laser-Nephelometrie besteht darin, daß gewisse Serumproben spontan mit dem Ansatzpuffer, der von der Herstellerfirma der Laser-Nephelometer geliefert wird (Hyland, California), präzipitieren.

1.3.2.3 Radioimmunassay:

Das empfindlichste und neueste Verfahren zur Lysozymbestimmung ist ein RIA (48). Diese Methode erfaßt Konzentrationsbereiche von 0,005 - 100 µg/ml Lysozym. Sie ist vor allem für Untersuchung des Liquors geeignet, der sehr niedrige Konzentrationen aufweist. Das Radioimmunassay ist als Solid-Phase Methode aufgebaut, die spezifischen Antikörper sind an Polyacrylamid Glaskugeln gekoppelt. Das Lysozym ist mit ^{125}J radioaktiv markiert. Als Standard dient kaltes Human-Lysozym. Die Standardproben zeichnen sich durch sehr niedrige Varianzen aus (48).

Zusammenstellung der einzelnen Methoden

Autor	Prinzip	Anwendungs- bereich	Gefundene Normal- werte im Serum	Intraassay- Varianz
Richard, Porry (24)	Photometer, Bakteriolyse	0,1 - 10 µg	./.	./.
Osserman, Lawler (14)	Lysoplate	5 - 500 µg	ca. 7 µg/ml	./.
Borgen, Romslo (38)	Nephelometrie	>0,1 µg/ml	3,6 - 7,8 µg/ml	3,4%
D'Orazio, Meyerhoff (39)	Potentiometrie	>1,0 µg/ml	8 - 9 µg/ml	9%
Mintz, Herbold (40)	Fluoreszenzmessung	>1 µg/ml	7 - 16 µg/ml	13%
Johnston, Neuhaus (43)	Elektronenresonanz	>0,15 µg/ml	./.	./.
Klass, Hopkins (42)	Kolorimetrie	>100 µg/ml	./.	4%
Malmquist, Johansson (44)	Immunoelektrophorese	>0,3 µg/ml	1,2 - 4,4 µg/ml	4%
Goudswaard, Virella (46)	Laser-Nephelometrie	>1 µg/ml	1,8 - 11,0 µg/ml	8%
Tischendorf, Haas (48)	Radioimmunoassay	0,005 - 100 µg/ml	./.	1,8%

Die Ergebnisse der einzelnen Methoden sind sehr unterschiedlich. Unabhängig von der Bestimmungsmethode ergeben sich Differenzen, die durch Verwendung von Hühner-eiweiß-Lysozym als Standard gegenüber Human-Lysozym auftreten, da letzteres 3 - 4 mal aktiver ist als Hühner-eiweiß-Lysozym. Dadurch ergeben sich bei den immunochemischen Methoden von vorneherein niedrigere Werte.

In der medizinisch-diagnostischen Anwendung der Lysozymbestimmung wurden bisher nur der Photometertest und die Lysoplatemethode angewendet. Da diese zwei Methoden ein indirektes Verfahren darstellen, auf dem bakteriolytischen Verhalten von Lysozym aufbauend, sind die Untersuchungen mit den ganzen Fehlermöglichkeiten dieser Gruppe behaftet.

Hinsichtlich der Durchführung ist der Lysoplate-Test ohne apparativen Aufwand billig auszuführen, benötigt aber etwa eine Nacht Inkubationszeit gegenüber dem schnellen Photometertest. Zwischen den beiden Methoden besteht nach Ansicht mancher Autoren eine gute (49,50), nach Untersuchungen anderer eine schlechte Korrelation (42).

Durch die große Anzahl Parameter, die Effekte auf die Tests haben: Ionenstärke, pH, Standard, Agarose, Micrococcus-Konzentration, Inkubationszeit, Serumzusammensetzung (30), kommen bei medizinischen Diagnostikuntersuchungen widersprüchliche Ergebnisse zustande (51, 52, 53, 54).

Der grundsätzliche Nachteil aller bakteriolytischen Assays ist die Unspezifität, da von der ungesicherten Voraussetzung ausgegangen wird, daß Lysozym die einzige Substanz in biologischen Flüssigkeiten ist, die Bakterienzellwände lysiert. Demzufolge bedeutet die Entwicklung spezifischer immunologischer Tests einen Fortschritt in der Spezifität (44, 46, 48).

Die empfindlichste Methode ist in dieser Gruppe das Radioimmunassay (48), während zeitlich das Laser-Nephelometerverfahren (46) eine sehr schnelle Bestimmung erlaubt. Da die Verfahren erst in jüngerer Zeit entwickelt wurden, liegen nur wenige Aussagen über deren diagnostischen Möglichkeiten vor.

2.

PROBLEMSTELLUNG

=====

Zur Ausführung der immunchemischen Analysenverfahren ist ein spezifisches Antiserum notwendig. In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob hinsichtlich der antigenen Determinanten sowie der elektrophoretischen Mobilität der Lysozyme von verschiedenen Patienten mit Monocytenleukämie ein Unterschied besteht. Zur diagnostischen Auswertbarkeit der immunologischen Testmethoden ist es Voraussetzung, daß Lysozym bei verschiedenen Patienten gleiche immunologische Eigenschaften aufweist. Zu diesem Zweck wurde von 3 an monocytärer Leukämie erkrankten Patienten Lysozym aus Urin isoliert. Gegen eines dieser Lysozyme wurde ein spezifisches Antiserum hergestellt. Mit diesem Anti-Lysozymserum und zwei weiteren käuflichen Anti-Lysozymen wurde die immunologische und elektrophoretische Gleichheit der 3 Lysozyme untersucht. Auf die Möglichkeiten der Lysozymaktivitätsbestimmungen für die medizinische Diagnostik wird eingegangen.

3. MATERIAL UND METHODEN

=====

3.1 Chemikalien und Geräte

Die verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Behringwerke Marburg:	Rinderserumalbumin, Anti-Human-Serum.
Boehringer Mannheim:	Micrococcus lysodeikticus lyophilisiert, Hühnereiweiß-Lysozym.
Serva Heidelberg:	Acrylamid, Bisacrylamid, Coomassie Brilliant Blue, Agarose.
LKB Schweden:	Anti-Lysozym-Serum.
Pharmacia, Uppsala:	Sephadex.
Whatman England:	P-Cellulose, DEAE-Cellulose.
Union Carbide:	Dialyseschläuche.

Alle anderen Chemikalien waren Produkte der Firma Merck, Darmstadt, mit dem Reinheitsgrad "pro analysi".

Die UV Absorption der Eluate der Säulenchromatographien, die automatische Registrierung und Fraktionierung wurden mit Geräten der Firma LKB Producter, Bromma Schweden, gemessen bzw. durchgeführt. Konstanter Säulendurchfluß wurde mit Perpex-Pumpen erreicht, Gradienten in einem Gradientenmischer von LKB hergestellt. Die Chromatographieprozesse wurden bei 4⁰ C durchgeführt.

Die optische Dichte der Proteinfractionen und der Lysozymaktivitätsbestimmungen wurden an einen Zeiss-Spectro-

photometer PMQ II und III bestimmt.

Polyacrylamid Gelelektrophoresen von Protein wurden an einer hauseigenen Apparatur durchgeführt.

Immunelektrophoresen und andere immunologischen Tests wurden sämtlich mit der LKB-Standardausrüstung mit Zubehör (Fa. LKB Producter, Schweden) durchgeführt.

3.2 Isolierung des Gesamteiweißes aus Urin von Patienten mit monocytärer Leukämie (14)

Die Harne wurden gewonnen von 3 Patienten mit schwerer, histologisch nachgewiesener Monocytenleukämie. Die Urine wurden getrennt aufgearbeitet.

Der gesammelte Urin wurde bei -2°C gelagert, bis zur Sättigung mit Ammonsulfat versetzt und mehrere Tage bei -2°C stehengelassen. Soweit nicht anders angegeben, wurden alle weiteren Arbeiten bei 4°C ausgeführt. Das Präzipitat wurde abzentrifugiert, in Sörensenpuffer 0,9% NaCl pH 7,2 suspendiert und gegen den gleichen Puffer dialysiert. Die ausfallenden, unlöslichen Bestandteile wurden abzentrifugiert und der klare Überstand gegen NaOH-Glycin-Puffer pH 9,5 dialysiert.

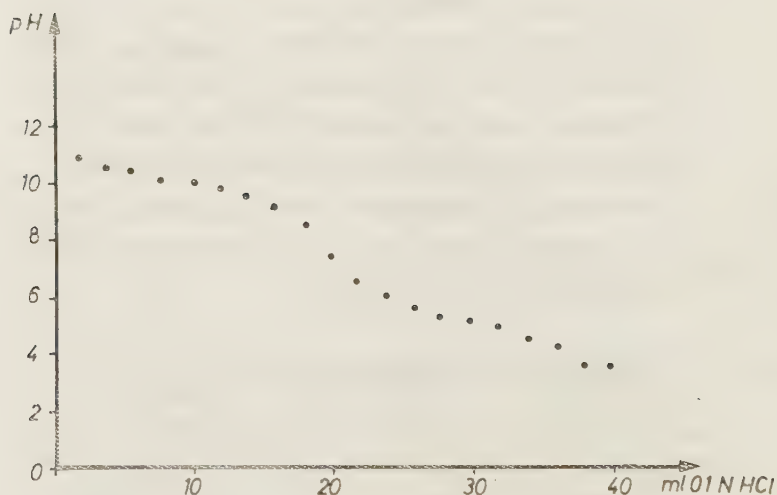
3.3 Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose

DEAE-Cellulose (Whatman DE-32) ist ein stark basischer Anionenaustauscher, der bis zu einem pH von ca. 10 verwendbar ist. Lysozym mit einem p_I von 10,5 passiert den Austauscher ungehindert, während die anderen Urineiweiße zurückgehalten werden.

Der Austauscher wird in 15 Volumenteile 0,5 N HCl eingerührt und 30 min stehengelassen. Anschließend wird bis pH 4 gewaschen. Daraufhin wird der Austauscher mit der

entsprechenden Menge 0,5 N NaOH gleichermaßen behandelt. Dann wird mit Wasser neutral gewaschen und die Kapazität durch Titration mit 0,1 N HCl ermittelt. Die DEAE-Cellulose wird in vorgenanntem Glycin-Puffer pH 9,5 aufbewahrt.

Zur Chromatographie wurden kühlbare Chromatographiesäulen, Durchmesser 32 mm, (Fa. Vorndran, Erlangen) verwendet, deren Ausfluß mit Glaswolle zugestopft und darüber eine Schicht Glaskugeln gegeben wurde. Das Gelbett betrug 16 cm, die Flußrate 20 ml/h. Es wurde über Nacht äquilibriert.



Kapazitätsbestimmung von DEAE-Cellulose

3.4 Ionenaustausch an Phospho-Cellulose

10 g Phose-Cellulose P-11 (Whatman) werden in 350 ml Wasser suspendiert und mit 10 M NaOH auf pH 10,6 titriert. Das Gemisch wird sofort über einen Glasfritten-Trichter abgesaugt. Die P-Cellulose wird bis zum Neutralpunkt gewaschen. Anschließend wird das Material wieder in 350 ml H₂O aufgenommen, mit 25% HCl auf pH 1 gebracht und wieder neutral gewaschen. Zur Kontrolle wird eine Kapazitätsbestimmung durchgeführt: Im Meßzylinder 7,1 ml vorbehandelte P-Cellulose absitzen lassen (entspricht 1 g trockener Cellulose). Diese Menge wird nach Überführen in ein 100 ml Becherglas mit 0,1 N NaOH titriert. Derartig behandelte P-Cellulose hat eine 3,7-fache Kapazität im Vergleich zu unregenerierter P-Cellulose.

Bei Phospho-Cellulosen handelt es sich um mittelstark saure Kationenaustauscher. Der Austauscher wird mit Tris-Puffer pH 7,2 äquilibriert. Bei pH 7,2 liegt das stark kationische Protein Lysozym positiv geladen vor und wird am Austauscher zurückgehalten. Eluiert wird mit einem NaCl-Gradienten in Tris-Puffer pH 7,2. Der Säulendurchmesser beträgt 38 mm, das Gelbett 28 - 30 cm, der Durchsatz 15 - 20 ml/h.

3.5 Ionenaustausch an CM-Sephadex C-50

Sephadex-Ionenaustauscher werden aus neutralen Sephadex-typen durch Substitution mit funktionellen Austauschergruppen gewonnen. Die Sephadex Matrix ist ein modifiziertes Dextran, dessen Polysaccharidketten zu einem dreidimensionalen Raumgitter vernetzt worden sind. An die Glucose der Dextranketten sind über Ätherbrücken die funktionellen Austauschergruppen gebunden. CM-Sephadex C-50 hat eine Carboxymethylgruppe mit Na-Gegenionen. Die Porosität ist

größer als bei den C-25 Typen. Porösere Typen haben eine höhere Kapazität für Moleküle, die in die 50er Matrix besser eindringen können. Eine Vorbehandlung des schwach-sauren Kationenaustauschers CM-Sephadex C-50 ist nicht notwendig. Es genügt, ihn 2 Tage bei Raumtemperatur in dem gewünschten pH quellen zu lassen: Tris-Puffer 0,05 M, pH 7,2. Die Säulenfüllung beträgt 30 cm bei 20 mm Durchmesser. Äquibriert wird mit Tris-Puffer 0,05 M pH 7,2, eluiert mit steigender Ionenstärke mittels NaCl-Gradienten in Tris-Puffer pH 7,2. Das Durchsatzvolumen bewegt sich bei ca. 6 - 8 ml/h.

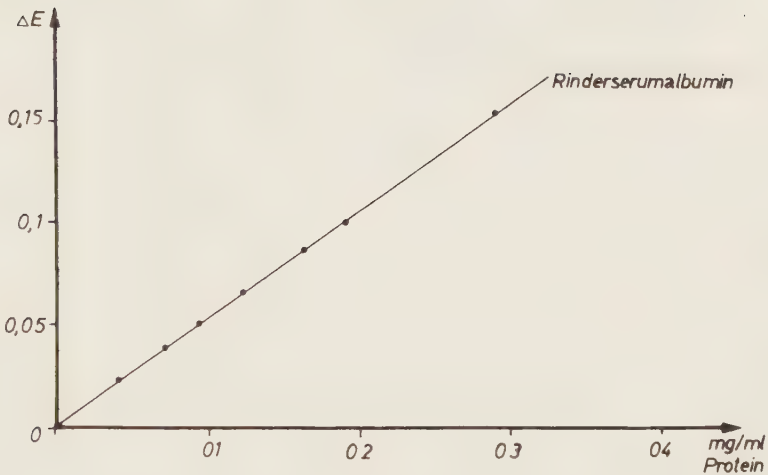
3.6 Proteinbestimmung durch UV-Absorption (Flankenmessung) (15)

Hier wird die Absorption der NH-Bande bei 215,5 und 225 nm gemessen. Als Bezugssubstanz dient Rinderserumalbumin (Behringwerke).

Die Extinktionsdifferenz wird gegen den Lysozymgehalt aufgetragen. Dadurch ergibt sich als Berechnungsfaktor:

Bezogen auf Rinderserumalbumin ($d = 1,0 \text{ mm}$) $f = 1,9$.

Diese Methode führt nur bei reinen Proteinlösungen zu verlässlichen Werten. In den unbehandelten Harnen wurde der Gehalt nach Lowry bestimmt.



Eichkurven für Proteinbestimmung mit der Flanken-
meßmethode.

3.7 Proteinbestimmung nach Lowry

Reagenzien: A) 4,0 g Na_2CO_3 wasserfrei
0,03 g $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$
0,0872 g NaK-tartrat add 100 ml H_2O

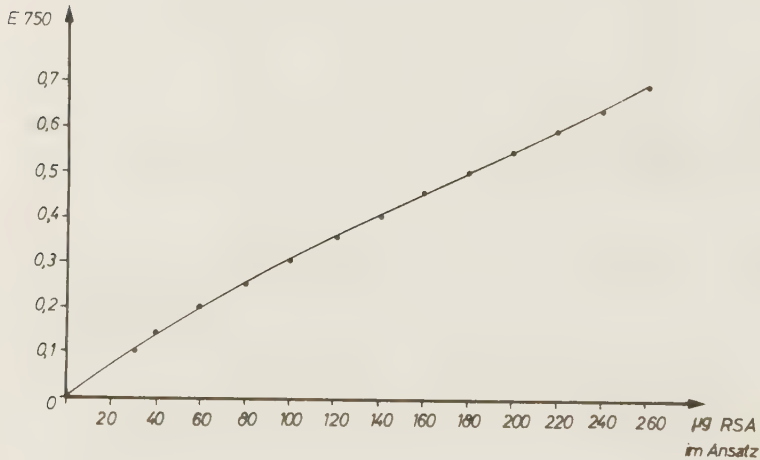
B) Folin-Cialteus-Reagenz
(1:1 mit Wasser verdünnt).

Die zu untersuchende Probe wird auf 0,5 ml Endansatz
pipettiert:

z. B. 0,2 ml Probe + 0,3 ml H_2O
0,4 ml Probe + 0,1 ml H_2O

Zu der Probe gibt man 5 ml Reagenz A und läßt 30 min
bei 37° C. stehen. Dann werden 0,5 ml verdünntes Folin-

Cialteus-Reagenz zugegeben. Nach nochmaligem Abwarten von 20 min bei 37°C wird bei 750 nm gegen den Leerwert gemessen. Die Berechnung erfolgt in Beziehung zu Rinderserumalbumin als Standard.



Eichgerade mit Rinderserumalbumin

3.8

Analytische Disk-Elektrophorese an Polyacrylamid-
zylindergelen

Glasröhrchen 6x 150 mm werden einseitig mit Parafilm verschlossen und in entsprechenden Abständen markiert (Abb.)



Als Gelsystem verwendet man ein modifiziertes Polyacrylamidgel-system nach Maurer (16)

Sammelgel 2,5%ig, pH 6,7
3 cm hoch
Trenngel 7%ig, pH 4,3
7,5 cm hoch

Lösungen:

A: 1 N KOH 48 ml
Eisessig 17,2 ml
Temed. * 4,0 ml
add 100 ml H₂O
pH 4,3

B: Acrylamid 28 g
Bisacrylamid 0,735 g
add 100 ml H₂O

C: Ammoniumper-sulfat 0,28 g
add 100 ml H₂O

D: 1 N KOH 48,0 ml
Eisessig 2,87 ml
Temed.* 0,46 ml
add 100 ml H₂O
pH 6,7

E: Acrylamid 10,0 g
Bisacrylamid 2,5 g
add 100 ml H₂O

F: Riboflavin 4,0 mg
add 100 ml H₂O

* N, N, N', N'-Tetramethyläthylendiamin

Mischungsverhältnis für Trenngel pH 4,3, 7%ig:

1 Teil	A
2 Teile	B
1 Teil	H ₂ O
4 Teile	C

Mischungsverhältnis für Sammelgel pH 6,7, 2,5%ig:

1 Teil	D
2 Teile	E
4 Teile	H ₂ O
1 Teil	F

Es handelt sich bei beiden Gelen um Radikalkettenpolymerisation. Im Sammelgel werden die Radikale aus Riboflavin durch UV-Belichtung induziert.

Die Laufstrecke beträgt insgesamt 9 cm

Elektrodenpuffer pH 4,5

β-Alanin	31,2 g
Eisessig	0,8 ml
add 1000 ml H ₂ O	

Zum Gebrauch auf 10%ige Lösung verdünnen.

Die Probe wird in 30% Glucoselösung mit einer Kolbenspritze auf die pufferüberschichteten Gele aufgetragen, um Substanzverluste an den Elektrodenpuffer möglichst zu vermeiden.

Als Marker wird Methylenblau zugegeben.

Polung: Anode oben
 Kathode unten.

Stromstärken: 0,5 mA/Gelzylinder bei Start
 1,0 mA/Gelzylinder, wenn Probe im
 Sammelgel
 2,0 mA/Gelzylinder, wenn Probe im
 Trenngel.

Proteineinfärbung mit Coomassie-Blue:

5,5 g Coomassie-Blue G-250

1000 ml Methanol

1000 ml H₂O

200 ml Eisessig

Die Lösung läßt man mindestens 3 h rühren und filtriert dann durch ein hartes Filter ab. Man inkubiert die Gele 30 min und entfärbt bei 60° C im Trockenschrank

Entfärber: Methanol / Eisessig / Wasser
 (125/375/400 ml)

3.9

Bestimmung der Lysozymaktivität

Spektrophotometrisch (17)

Eine Suspension von *Micrococcus lysodeikticus* wird durch Lysozym geklärt. Der Extinktionsabfall pro Minute wird gemessen.

Lösungen:

Phosphatpuffer 1,0 M pH 7,0

M. lysodeikticus-Suspension

100 mg *M. lysodeikticus* (*Micrococcus luteus*, Boehringer Mannheim) wird mit sehr wenig H₂O in einer Achatschale verrieben, überspült und auf 50 ml aufgefüllt. Die Extinktion wird gegen Luft auf $0,85 \pm 0,5$ (d = 1 cm) eingestellt. Gemessen wird bei 450 nm, Testvolumen: 3,00 ml, Schichtdicke: 1 cm, Temperatur: 25° C

M. lysodeikticus Suspension 2,84 ml

Phosphat-Puffer 0,15 ml

mischen, Extinktion ablesen, die mindestens 3 min konstant bleiben soll. Die Reaktion wird gestartet durch Zugabe von 0,01 ml Probelösung. `

Nach 1, 2 und 3 min wird die Extinktion abgelesen und aus $\Delta E/\text{min}$ der Mittelwert gebildet.

Berechnung: Eine Einheit ist die Enzymmenge, die unter Testbedingungen eine Extinktionsabnahme um 0,001 /min hervorruft.
 $\Delta E/\text{min} \times 100.000 = \text{Einheiten/ml Probelösung}$
Die Extinktionsabnahme pro min soll 0,030 ΔE nicht überschreiten.

Lyso-Plate Assay Methode (14)

Diese Methode wurde hier zum qualitativen Nachweis von Lysozym in Elektrophoresegelen verwendet. M. lysodeikticus wurden in einem Achatmörser homogen verrieben und in 1%igen Agar in 1/15 M Phosphatpuffer suspendiert und die Lösung auf ca. 60 - 70 ° C erhitzt. Die Konzentration soll 50 mg Microorganismen in 100 ml gepuffertem Agar betragen.

Der heiße Agar wird in Petri-Schalen gegossen ca. 4 mm hoch. Die erstarrten Agarplatten können bei 4 - 10 ° C unbeschadet mehrere Wochen gelagert werden, falls sie gegen Austrocknung geschützt sind.

In die Platten werden ca. 2 mm große Löcher gestanzt, die Proben eingefüllt und bei Raumtemperatur belassen. Die Durchmesser der Lysezonen sind proportional dem Logarithmus der Lysozymkonzentration.

Die Entwicklung der Lysezonen benötigt ca. 12 - 18 h bei 24 - 26 ° C. Die Erkennung der Grenzen der Zonen bereitet mitunter erhebliche Schwierigkeiten.

3.10 Immundiffusion nach Ouchterlony (20)

1 g Agarose wird mit 25 ml 0,15 m Phosphat-Pufferlösung pH 7,1 und 75 ml H₂O unter Zusatz von Natriumacid bis zum Sieden erhitzt. Auf gereinigte und getrocknete Objektträger ca. 3 ml pro Objektträger der noch heißen Lösung pipettiert. Nach Erstarrung des Gels stantzt man Auftragsbecken in das Gel (Ø 2 – 3 mm). Die Becken fassen etwa 10 – 15 µl Antiserum bzw. Antigen-Lösung. Nach Ausbilden der Präzipitationen in ca. 12 – 24 h werden die Agarplättchen 1 bis 2 Tage in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen um alles nicht präzipitierte Protein aus dem Agar zu entfernen. Die gewaschenen Gele, die auf den Trägern verbleiben, werden mit einem Filterstreifen bedeckt und bei Raumtemperatur getrocknet. Vor dem Färben legt man die Objektträger für 5 min in 2%ige Essigsäure.

Färbung: 1) 0,5% Amidoschwarz 10 B in Methanol-Eisessig (9:1). 5 – 10 min färben.
Entfärben mit Methanol-Eisessig (9:1),
ca. 15 min unter Sichtkontrolle.

oder 2) 0,5% Lichtgrün in 5%iger Trichlor-essigsäure (TCA) 1 h färben. Auswaschen mit 5%iger TCA unter Sichtkontrolle.

3.11 Immunelektrophorese nach Grabar und Williams, Scheideggerelektrophorese (18, 19)

1 g Agarose wird in 25 ml Diäthylbarbitursäure-Acetat-Puffer pH 8,2 (nach Michaelis) und 25 ml H₂O unter Zusatz von Natriumazid durch Siedehitze gelöst und auf Objektträger pipettiert. Nach Erstarrung werden zunächst

nur die Becken gestanzt, der Mittelgraben bleibt unausgehoben. Proben von ca. 10 - 15 µl Antigen-Lösung werden aufgetragen und bei 120 V über 3 h der Elektrophorese unterworfen (LKB oder CAMAG-Apparatur). Während der Prozedur werden die Agarplättchen gekühlt.

Elektrodenpuffer: Diäthylbarbiturat-Acetat nach
Michaelis pH 8,2.

Stammlösung: 29,43 g Natriumdiäthylbarbiturat
19,43 g Natriumacetat x 3 H₂O
add 1000 ml H₂O

Zu 8 Teilen Stammlösung gibt man 9,6 Teile H₂O und stellt mit 0,1 N HCl auf pH 8,2 ein. Die Lösung wird zum Gebrauch 1:2 mit H₂O verdünnt.

Nach beendeter Elektrophorese wird die Mittelrinne ausgehoben und mit Antiserum gefüllt. Nachdem nach 12 - 24 h die Immundiffusion beendet ist, verfährt man weiter wie bei der Ouchterlony-Prozedur.

3.12 Konzentrierung von verdünnten Lösungen mit einer Amicon 8 MG Apparatur

Unter Druck (max. 2 bar) wird die Flüssigkeit über eine UM-10 Membran, deren Trenngrenze bei Molekulargewicht 10.000 liegt, abgepreßt.

4. ERGEBNISSE
 =====

4.1 Isolierung der Gesamtproteine

Als Ausgangspunkt standen Sammelurine von 3 Patienten zur Verfügung, die unter klinisch nachgewiesener monocytärer Leukämie litten.

Der Proteingehalt in den Rohharnen wurde nach Lowry bestimmt:

	Gesamtmenge:	c _{Protein} :
Harn I	2 1	2,82 mg/ml
Harn II	9 1	4,93 mg/ml
Harn III	1,2 1	2,19 mg/ml

Somit ergibt sich ein totaler Proteingehalt:

Harn I	3,64 g
Harn II	44,37 g
Harn III	2,63 g

Lysozymaktivität (Spektrophotometrisch)

Harn I	860 U/mg Protein
Harn II	2895 U/mg Protein
Harn III	1200 U/mg Protein

Nach Fällung der Urinproteine mit Ammonsulfat und Dialyse gegen Glycin-NaOH-Puffer pH 9,5 wurde an der DEAE-Cellulose chromatographiert. Die durchlaufende Pufferflüssigkeit enthielt alle basischen Proteine einschließlich Lysozym. Auf der DEAE-Cellulose blieb eine ca. 1 cm breite gelbe Zone zurück, die die restlichen Urinproteine enthielt.

Nach der DEAE-Passage werden die Harne an einer Amicon-Zelle ankonzentriert. Das abgepreßte Filtrat aus der Amiconzelle wird auf Lysozymaktivität getestet und bei negativem

Ausfall verworfen. Anschließend wird gegen Tris-Puffer 0,05 M pH 7,2 dialysiert.

Es ergaben sich folgende Probenmengen und Proteingehalte: (in Tris-Puffer 0,05 M pH 7,2)

Probe I (von Harn I)	70 ml	c_{Protein} :	1,6 mg/ml
		Protein total:	112 mg
Probe II (von Harn II)	405 ml	c_{Protein} :	2,09 mg/ml
		Protein total:	847 mg
Probe III (von Harn III)	83 ml	c_{Protein} :	0,32 mg/ml
		Protein total:	26,8 mg

4.2

Disk Elektrophorese der Urinproteine nach DEAE-Passage

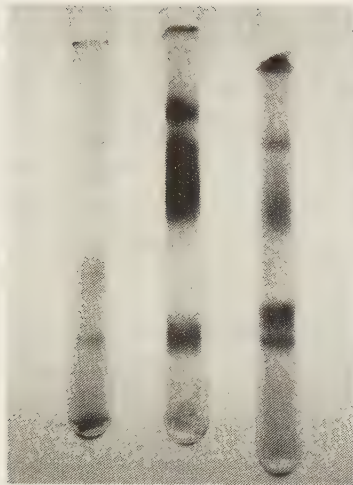
Von den vorfraktionierten Proteinlösungen wurde eine analytische Disk-Elektrophorese an Polyacrylamidgel angefertigt.

Gelkonzentration: 7%, pH 4,3

Auftragemenge: ca. 100 µg Protein.

Um ein Durchmischen mit dem Elektrodenpuffer zu verhindern, wurde Saccharose zugewogen (etwa 30%).

Je Probe wurde eine Doppel­elektrophorese ausgeführt. Ein Zylindergel wurde gefärbt, das andere ungefärbt in ca. 1 mm dicke Scheiben geschnitten und die Aktivität an Lysozym in den einzelnen Gelscheiben ermittelt.



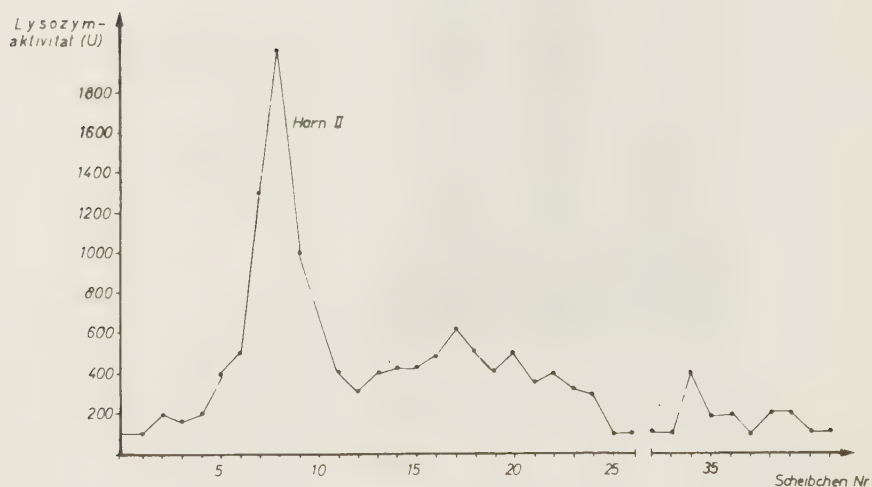
Disk-Elektrophorese
Auftragemenge 100 μ g
Protein
Coomassie-Färbung

Probe I Probe II Probe III

4.2.1 Ermittlung der Lysozymaktivität in Beziehung zu den Proteinbanden

Die LZM-Aktivität in den Gelscheiben wurde spektrophotometrisch ermittelt.

Im spektrophotometrischen Test wurden statt der Probelösung die Scheibchen in den Testansatz gebracht.



Trenngel

Das Enzym wanderte in der Disk-Elektrophorese bei pH 4,3 als kationisches Protein am schnellsten. In der Färbung entspricht es der vorderen Proteinbande.

4.2.2 Lagerung der vorgereinigten Untersuchungslösungen:

Nach der Konzentrierung in der Amicon Zelle wurden separate Proben à 500 µl abgenommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Proben wurden bei -70°C in einer Revco-Tiefkühltruhe gelagert. Probe Nr. II wurde zu weiteren Reinigung des Lysozyms herangezogen.

4.3 Ionenaustausch der gesamten Proteinelösung II an Phospho-Cellulose

Die Probe wurde in zwei Portionen aufgeteilt und einer präparativen Säulenchromatographie an Phospho-Cellulose unterworfen.

Die Versuchsanordnung wurde wie folgt ausgelegt:

Säulendurchmesser:	38 mm
Gelbett:	22 cm
Durchsatz:	21 ml/h
Gradient:	0 bis 1,5 M NaCl in 0,05 M Tris pH 7,2 über 24 h
Auftragemenge:	378 mg Protein

Das Gelbett schrumpfte mit steigendem Gradienten auf 18 cm zusammen. Bei Ende des Gradienten war noch nicht alles Protein von der Säule eluiert. Es wurde daher mit 1,5 M NaCl Tris nachgespült und ab Fraktion 63 ein Sekundärgradient bis 3,0 M NaCl Tris aufgesetzt. Die lysozymaktiven Fraktionen 51 - 66 wurden vereinigt und gegen Tris 0,05 M pH 7,2 dialysiert.

Die Fraktionen 17 - 50, die β -Globuline enthalten und keine Lysozymaktivität aufweisen, wurden ebenfalls vereinigt und gegen obigen Puffer dialysiert, um die NaCl-Konzentration im Eluat zu senken. Sie wurden Herrn

Prof. Geyer (Marburg) überlassen.

Der zweite Teil der Probe II wurde unter gleichen Bedingungen gereinigt.

Auftragemenge: 469 mg Protein

Durch das große Säulenvolumen und einen ca. 30 ml Überstand Auftragspuffer über dem Gelbett war nach Ablauf des Gradienten noch kein Protein im Eluat. Ab Fraktion 40 wurde daher ohne Gradient mit 1,5 M NaCl / Tris nachgespült und anschließend ab Fraktion 70 mit 2,5 M NaCl / Tris. Aufgrund der bisherigen Erfahrungen durfte angenommen werden, daß das Lysozym sich in dem letzten Gipfel befindet, was durch Aktivitätsuntersuchungen bestätigt wurde.

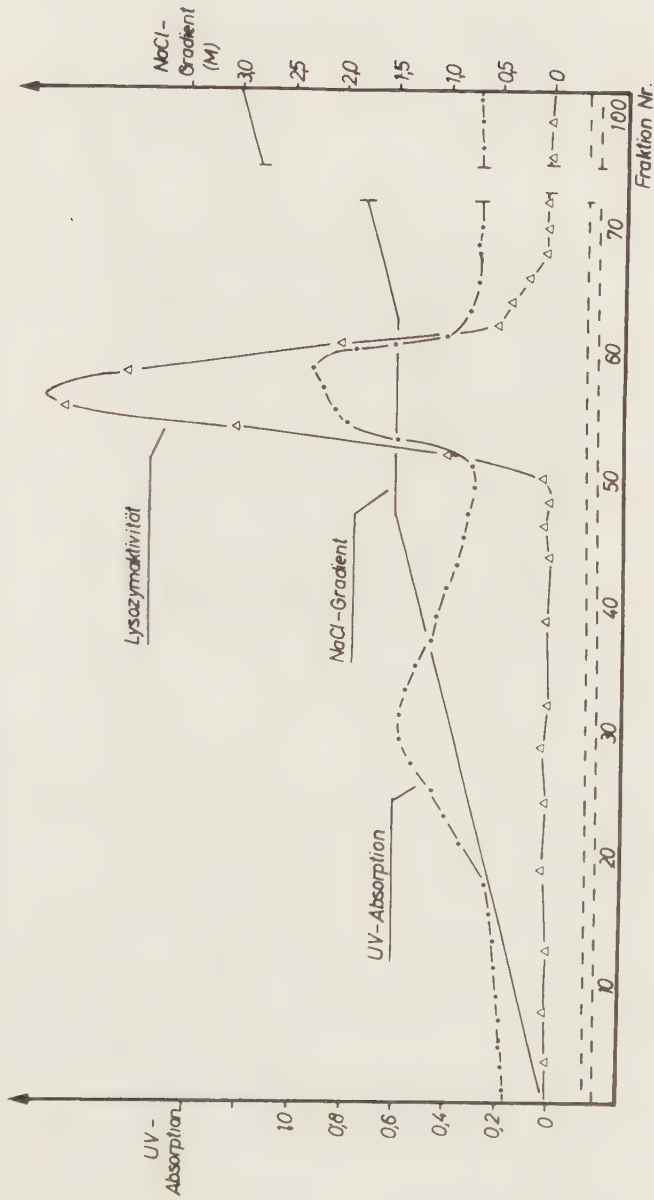
Die aktiven Fraktionen der 2. Hälfte wurden ebenfalls vereinigt (70 - 100) und gegen Auftragspuffer (Tris 0,05 M pH 7,2) dialysiert.

Die beiden Teilmengen (aktive Fraktionen aus der 1. und 2. Hälfte) wurden anschließend vereinigt:

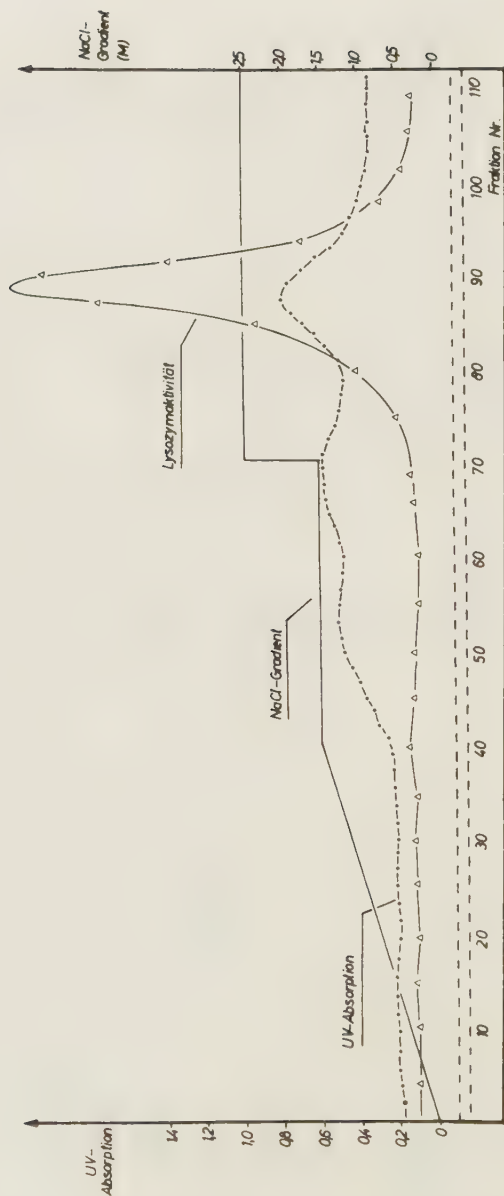
Gesamtmenge: 980 ml

c_{Protein} : 0,087 mg/ml

Totale Proteinmenge: 85,65 mg.



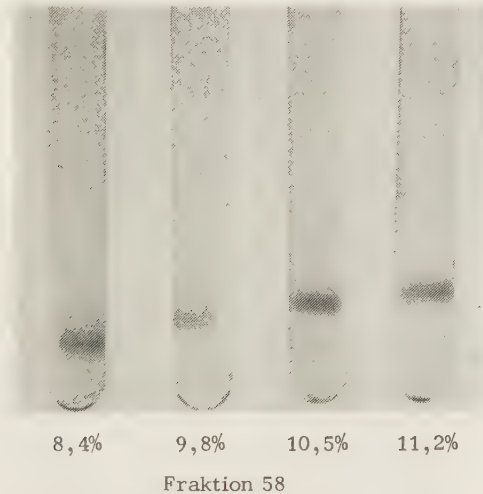
Chromatographie von Probe II (378 mg Protein) an P-Cellulose (1. Hälfte)



Chromatographie von Probe II (469 mg Protein) (2. Hälfte)

4.3.1 Disk-Elektrophorese der aktiven Fraktion 58 aus dem
P-Cellulose Lauf der 1. Hälfte

Zur Reinheitskontrolle des Enzyms wird eine Disk-Elektrophorese mit steigenden Konzentrationen an Polyacrylamid und damit steigender Vernetzung durchgeführt. Die Konzentrationsreihe umfaßt 8,4%, 9,8%, 10,5%, 11,2% Polyacrylamid.



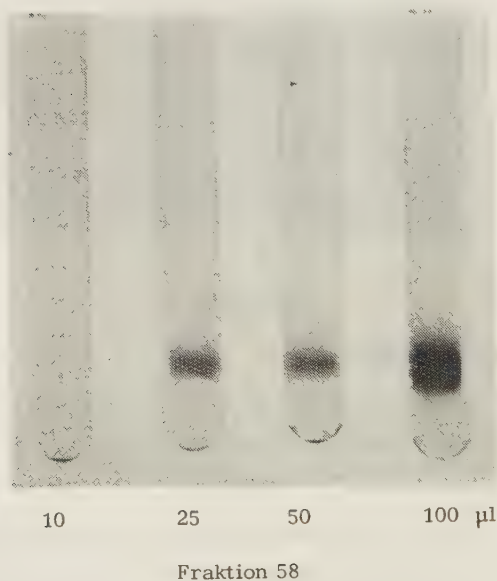
Es ist ersichtlich, daß

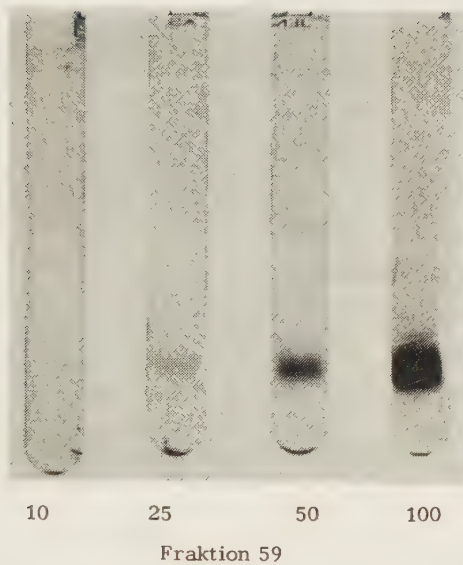
- a) die Lysozymbande zur steigenden Polyacrylamid-Konzentration hin retardiert wird, d. h. weniger weit in das Gel einwandert.
- b) die Bande sich mit zunehmender Gelkonzentration nicht weiter aufgliedert und somit angenommen werden muß, daß diese Bande aus tatsächlich nur einer einzigen Komponente besteht.

4.3.2 Überladungselektrophorese

Geringe Verunreinigungen an Fremdproteinen sind erst bei Überladung des Gels mit Probenprotein erkennbar. Es wurden vier Gele mit steigenden Konzentrationen elektrophoresiert.

	Fraktion 58	Fraktion 59
10 μ l	2,28 μ g	2,09 μ g
25 μ l	5,7 μ g	5,3 μ g
50 μ l	11,7 μ g	10,4 μ g
100 μ l	23,4 μ g	20,9 μ g





Man erkennt, daß

- a) mit steigender Substanzmenge die Wanderungsgeschwindigkeit im Gel absinkt und die Bande linear verzögert wird.
- b) nach der Lysozymbande bei hoher Substanzkonzentration noch eine leichte Färbung festzustellen ist.

4.4

Wiederholter Ionenaustausch von LMZ-aktiven Fraktionen an P-Cellulose

Aus den UV-Absorptionskurven ist klar ersichtlich, daß Protein aus dem ersten flachen Gipfel, der als Hauptbestandteil β -Globuline enthält, in die lysozymaktiven Anteile hineinreicht.

Zur weiteren Reinigung wurden daher die aktiven Fraktionen geschnitten, vereinigt und abermals an einer frisch regenerierten P-Cellulose der Ionenaustauschchromatographie unterworfen.

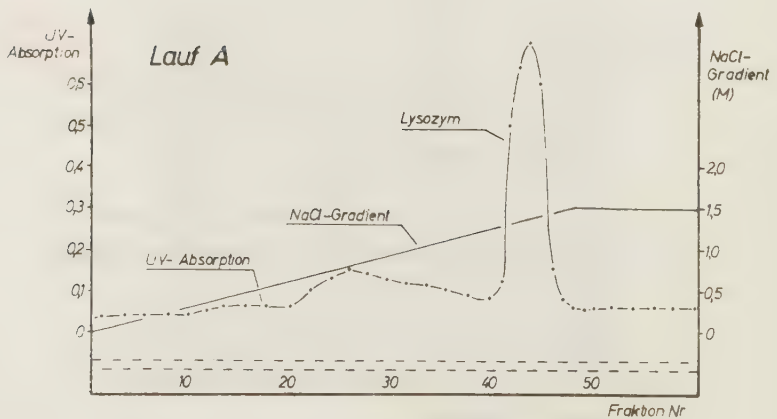
Die Gesamtproteinmenge wurde wiederum auf 2 Hälften aufgeteilt. Die Säule entsprechend den geringeren Proteinmengen verkleinert.

Säulendurchmesser: 20 mm

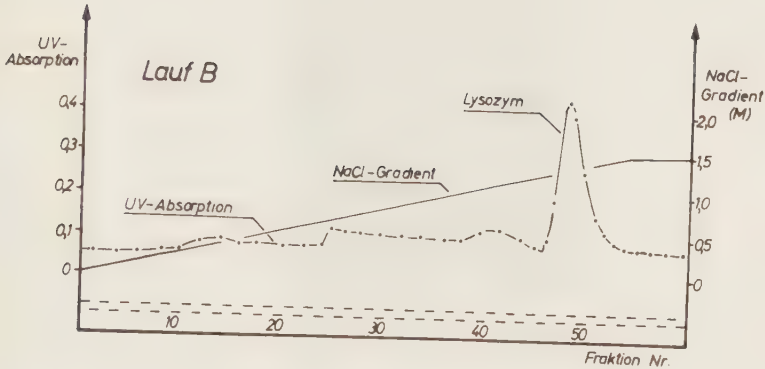
Gelbett: 29 cm

Durchsatz: 13,3 ml/h

Gradient: 0,2 M NaCl bis 1,5 M NaCl in
0,05 M Tris pH 7,2.



1. Hälfte



2. Hälfte

In Lauf A wurde eine Vorderflanke: Fr. 40 - 43

Mittelfraktion: Fr. 44

und eine

Hinterflanke: Fr. 45 - 50

geschnitten und dialysiert gegen 0,05 M Tris pH 7,2.

Lauf B:

Vorderflanke: Fr. 44 - 47

Mittelfraktion: Fr. 48 - 49

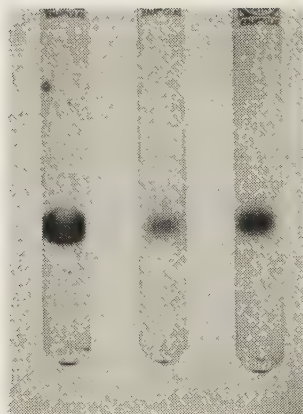
Hinterflanke: Fr. 50 - 55

Dialyse wie oben.

Mit diesen Eluaten wurde eine Disk-Elektrophorese durchgeführt:

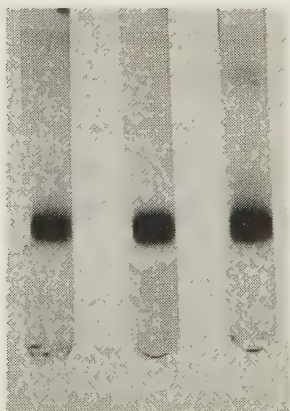
Gelkonzentration: 7%

Auftragmenge: ca. 20 µg Protein pro Röhrchen je geschnittenes Dialysat.



Vorder- Mittel- Hinter-
flanke fraktion flanke

Harn II-A-Lysozym nach zweimaligem
P-Cellulose-Lauf



Vorder- Mittel- Hinter-
flanke fraktion flanke

Harn-II-B-Lysozym nach zweimaligem
P-Cellulose-Lauf

4.5 Ionenaustausch des Lysozyms aus Harn II an CM-Sephadex C-50

Aus den vereinigten Schnitten aus Lauf A und B wurde erhalten: 170 ml mit 24.8 mg Lysozym.

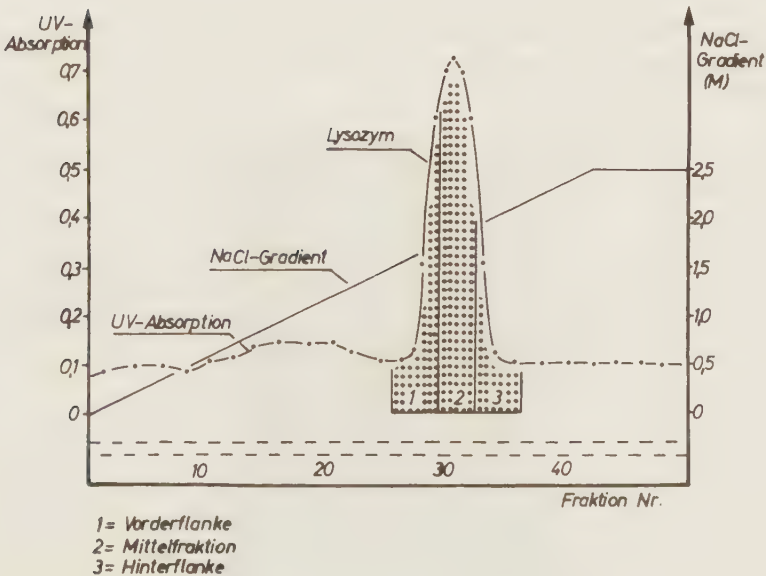
Um das Enzym völlig rein darzustellen wurde als schwach saurer Austauscher noch CM-Sephadex 50 angeschlossen

Säulendurchmesser: 20 mm

Gelbett: 30 cm

Durchsatz: 6,7 ml/h

Gradient: 0,2 M NaCl bis 2,5 M NaCl
in 0,05 M Tris pH 7,2.



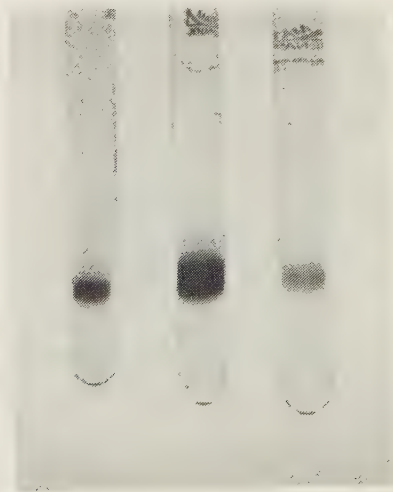
CM-Sephadex C-50 - Lauf von Harn II-Lysozym

Schnitt:

	c_{Protein} :	Aktivität:
Vorderflanke:		
Fr. 26 - 29	0,19 mg/ml	152000 U/ml
Mittelflanke:		
Fr. 30 - 32	0,6 mg/ml	444000 U/ml
Hinterflanke:		
Fr. 33 - 36	0,08 mg/ml	53600 U/ml
Spezifische Aktivität:	Fr. 26 - 29	800000 U/mg
	Fr. 30 - 32	740000 U/mg
	Fr. 33 - 36	670000 U/mg

Das entspricht einer Anreicherung gegenüber dem Rohharn von ca. 260 - 280-fach

Disk-Elektrophorese der Lysozymfraktionen nach Dialyse gegen 0,05 M Tris pH 7,2 0,2 M NaCl.



Vorder-
flanke

Mittel-
flanke

Hinter-
flanke

Die Fraktionen sind hinreichend rein. Elektrophoretisch ist keine Verunreinigung mehr nachweisbar.

Die Fraktionen werden an einer Amicon-Zelle eingengt.

Als Endprodukt liegen vor:

		^c Protein:
Vorderflanke:	7 ml	1,6 mg/ml
Mittelfraktion:	3 ml	2,99 mg/ml
Hinterflanke:	15 ml	0,46 mg/ml

Zur Immunisierung wird das Lysozym aus der Mittelfraktion verwendet.

Für die freundliche Überlassung des Immunserums sei Herrn Prof. Geyer (Marburg) recht herzlich gedankt.

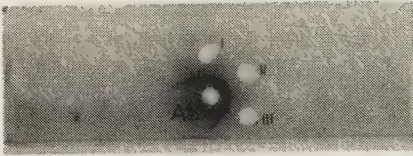
Mit diesem spezifischen Antikörper werden die drei verschiedenen Lysozyme der Rohharne miteinander verglichen.

Da das Immunisierungsentigen frei von Fremdproteinen war, braucht das Antiserum nicht am Rohharn absorbiert werden.

4.6

Ouchterlony Doppel-Immundiffusion

Zur Feststellung, ob die Antigene (Lysozyme) identisch sind, wird die Ouchterlony-Reaktion (20) durchgeführt.



I = Harn I

II = Harn II

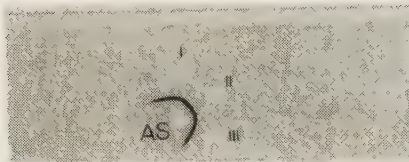
III = Harn III

AS = Kaninchenantiserum gegen Human Lysozym (Behringwerke)

I = Lysozym aus Harn I

II = Lysozym aus Harn II

III = Lysozym aus Harn III



I, II, III = Harne

I, II, III = Lysozym aus entsprechendem Harn

AS = Schafantiserum gegen Human Lysozym (LKB)



I, II, III = Harne

I, II, III = Lysozym aus entsprechendem Harn

AS = spezifisches monovalentes Kaninchenantiserum gegen Lysozym aus Harn II

Aus den Doppeldiffusionsversuchen zeigt sich, daß

- a) alle 3 Antiseren mit allen 3 leukämischen Harnen Präzipitationsbanden ergeben.
- b) die Präzipitationsbanden gleich stark beschaffen sind.
- c) bei keiner der 3 Präzipitationsbanden eines jeden Diffusionsversuches eine Spornbildung auftritt.

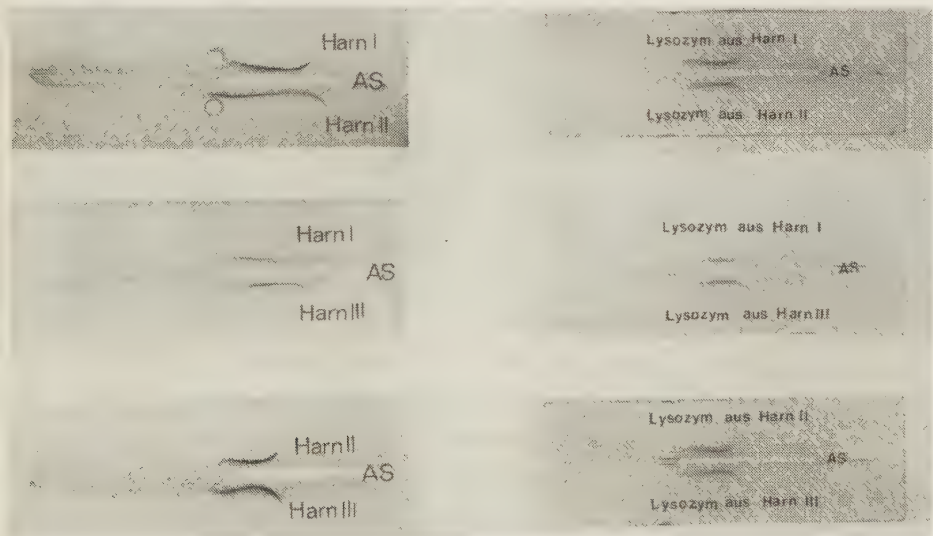
4.7

Immunelektrophorese nach Scheidegger

Um die elektrophoretische Mobilität vergleichen zu können, wird eine Immunelektrophorese durchgeführt. Es werden jeweils die Rohharnen miteinander verglichen.

Stromspannung: 120 V

Dauer: 3 h.



Immunelektrophorese der Harne
gegen spezifisches II-Lysozymanti-
serum

Immunelektrophorese der Lysozyme
aus den entsprechenden Harnen gegen
II-Lysozymantiserum

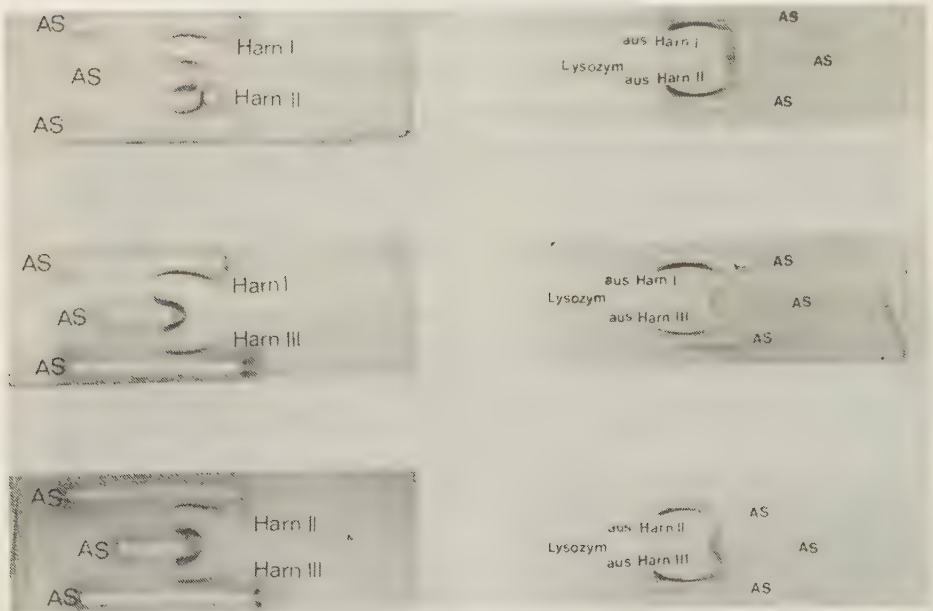
4.8

Immunelektrophorese nach Grabar und Williams

Bei dieser modifizierten Technik entstehen hirschhorn-
artige Präzipitationsbanden die fusionieren

Stromspannung: 120 V

Dauer: 3 1/2 h.



Immunelektrophorese der Harne
gegen spezifisches II-Lysozym-
antiserum

Immunelektrophorese der Lysozyme
aus den entsprechenden Harnen gegen
spezifisches II-Lysozymantiserum

Im Ouchterlony Test zeigen alle 3 Harnen ein singuläres Präzipitationssystem. Die Formation entspricht dem sogenannten "Fusionsmuster der Identität".

Bei keinem der Harnen tritt eine Spornbildung auf. Daraus läßt sich schließen, daß alle drei Lysozyme in den Harnen identisch sind und gleiche Anzahl antigener Determinanten besitzen, Ouchterlony (20).

Die Präzipitationsbanden haben sich näher am Antiserumpool ausgebildet, die Konvexseite der Krümmung ist dem Antigenreservoir zugewandt. Man schließt daraus, daß das Antiserum ein höheres Molekulargewicht hat. Da die Banden näher am Antiserumpool liegen, ist anzunehmen, das Antigen im Überschuß vorhanden war.

Das selbe Fusionsmuster zeigte sich auch mit anderen Antilysozymseren. Die schärfsten Banden entwickelten sich mit Antilysozym der Fa. LKB. Mit dem käuflichen Antiserum der Behringwerke erhielt man etwas aufgefuselte Präzipitationsbanden. Dies ist wahrscheinlich auf größere Mengenunterschiede zwischen Antigen und Antiserum zurückzuführen. Mit dem spezifischen Antiserum gegen Lysozym II zeigt sich noch eine sehr schwache Bande zusätzlich auf der Antiserumseite des Präzipitationssystems. Diese schwache Linie tritt bei den beiden anderen Harnen I und II ebenfalls auf.

Es könnte sich dabei um ein zweites Präzipitationssystem vom Typ Antikörper - Antiserum handeln, z. B. zurückzuführen auf eine Verunreinigung im isolierten Lysozym, die dann aber in den anderen Harnen ebenfalls vorhanden sein muß. Da in der Disk-Elektrophorese das Antigen (Lysozym II) nachweislich ohne Verunreinigungen dar-

stellbar war, handelte es sich wahrscheinlich um Sekundärpräzipitate vom Typ der Liesegang Präzipitine (55). Bei einer Wiederholung mit reduzierten Substanzmengen konnten keine Sekundärpräzipitate mehr beobachtet werden.

Die Immunelektrophorese zeigt keine Auffälligkeiten. Die Banden sind unterschiedlich gefärbt und geformt, was auf Konzentrationsunterschiede zurückzuführen ist. Bei gleicher Elektrophoresedauer wandern die gereinigten Lysozyme schneller als die Lysozyme im Harn. Das wird entweder verursacht durch die Konzentrationsunterschiede zwischen gereinigten Lysozymen und Lysozym im Rohharn, da niedrig konzentrierte Lysozymlösungen einen starken Abfall in der Wanderungsgeschwindigkeit zeigen (35), oder durch Bindung an andere Eiweiße, die in pathologischen Urinen zugegen sind.

Die Präzipitationsbanden der jeweiligen Rohharn- und Lysozymfraktionen sind einheitlich und geben keinen Hinweis auf differenzierte elektrophoretische Anteile.

In der nach Grabar, Williams modifizierten Technik fusionieren die Banden auf gleicher Höhe und schließen eine gröbere Wanderungsgeschwindigkeitsabweichung untereinander aus. Durch den Einfluß der Proteinkonzentration auf die Mobilität wird die Beurteilung der Elektrophoresen erschwert. Es bieten sich jedoch keine Anhaltspunkte für Isoenzyme (56, 35).

5. DISKUSSION =====

Mit radioaktiv markiertem Humanlysozym wurde gezeigt, daß die Synthese von endogenem Lysozym in den neutrophilen Granulocyten, Gewebemakrophagen, Monocyten (57) und im Knorpel stattfindet (58). Die neutrophilen Granulocyten tragen den größten Teil zum Plasmalysozym bei. Die Tagesproduktion von gesunden Menschen beträgt schätzungsweise 1000 mg.

Lysozym, das wegen seines geringen Molekulargewichtes die Glomerula passieren kann, wird im proximalen Tubulus aktiv aus dem Glomerulumfiltrat rückresorbiert. Nach Pruzanski et al. (59) beträgt die arterielle Lysozymkonzentration im Mittel $7,5 \mu\text{g/ml}$, während in der Nierenvene $6,9 \mu\text{g/ml}$ gemessen wurden. Bei einigen Versuchspersonen konnte keine Differenz zwischen Arterien und Nierenvene festgestellt werden, niemals jedoch lag die venöse Konzentration über der arteriellen. Die Lysozymclearance ist mit $0,04 \text{ ml/min}$ als sehr niedrig anzusetzen. Die Weiterbehandlung des Lysozyms nach der Resorption durch die proximalen Tubuluszellen ist noch völlig unklar. Es kann als aktives Enzymmolekül an den Kreislauf zurückgegeben werden oder teilweise bzw. vollständig in der Niere abgebaut werden. In den proximalen Tubuluszellen wird das Lysozym in phagolysomalen Organellen sowie im Cytoplasma gespeichert.

Lysozym ist charakterisiert durch das Vorhandensein eines niedrigschwelligen Transportsystems im proximalen Convolut. Eine Sättigung des Rückresorptionsmechanismuses von Lysozym tritt bei $1,5 - 2,0 \text{ mg/min}$

auf (59). Trotz der hohen Transportkapazität ist die Schwelle ab der Lysozym im Urin erscheint sehr niedrig. Lange vor Sättigung des Transportmechanismus steigt ab Serumwerten von 25 - 30 $\mu\text{g/ml}$ die Urinexkretion merklich an. Eine Schädigung des proximalen Tubulus ist durch die Lokalisation des Lysozymtransportsystems immer mit einem Versagen desselben und mit einer Lysozymurie vergesellschaftet. Patienten mit Acidose und Schäden im distalen Convolut entwickeln keine Lysozymurie (60). Intoxikationen, die vor allem die Nieren beeinflussen, rufen schwere Lysozymurien hervor, z. B. Quecksilberchlorid bei Ratten (61). Klinisch ist die Lysozymmessung brauchbar für die Diagnose und den Verlauf von Tubulusschäden im weitesten Sinne. Differentialdiagnostisch hat eine Lysozymbestimmung bei Nierenkranken jedoch keine Bedeutung. Wichtiger scheint die Lysozym-Kontrolle bei Nierentransplantationen zu sein. Nach einer beidseitigen Nephrektomie steigt der Plasma-Lysozymspiegel stark an. Wird eine Nierentransplantation vorgenommen und nimmt das Transplantat seine Funktion auf, so sinkt die Konzentration des Plasma-lysozyms kontinuierlich erneut zur Norm ab. Die Dauer des erhöhten Lysozymspiegels korreliert mit der Funktionsaufnahme des Transplantats. Sofort arbeitsfähige verpflanzte Nieren senken den Lysozymspiegel innerhalb von 9 Tagen auf den Normalwert ab. Bei abgestoßenen Transplantaten bleibt der Spiegel über 26 Tage hinaus erhöht. Das Absinken der Plasmalysozymkonzentration trotz abgestoßener Transplantate wird durch die immunsuppressive Therapie mit Azathioprin hervorgerufen. Azathioprin scheint außerdem direkt die Synthese von Lysozym zu hemmen (62).

Nach einer Transplantation sind im Urin noch sehr hohe Lysozymwerte zu finden, die nach Funktionsaufnahme des tubulären Apparates abklingen bis nach einer gewissen Zeit die Lysozymurie völlig verschwindet (62).

Lysozym in Sarkoidose und Tuberkulose

Tuberkulose ruft eine Erhöhung des Plasmalysozymspiegels hervor (63). Klockars et al. (65) fanden bei Untersuchungen der Pleuraflüssigkeit von tuberkulösen und nichttuberkulösen Exsudaten eine Erhöhung des Lysozyms sowohl im Pleuraexsudat als auch im Plasma gegenüber nichttuberkulösen Lungenaffektion wie z. B. Carcinomen oder Kollagenosen. Die Pleuraexsudatkonzentration überstieg dabei immer die des Plasmas.

Die Untersuchung von Lymphknoten, Lungen und Seren von Sarkoidosekranken auf Lysozym und Angiotensinconvertierende Enzym erbrachte eine beträchtliche Erhöhung des Lysozyms in sarkoiden Lymphknoten gegenüber normalen Lymphknoten. Es ist anzunehmen, daß die erhöhten Serumlysozymspiegel durch Lysozymsynthese in den Granulomen hervorgerufen werden. Lysozym wird unter anderem in Makrophagen synthetisiert, die als Vorläufer der Epitheloid und Riesenzellen angesehen werden. Cumiskey et al. (66) fanden in 39 Sarkoidose-Patienten mit histologisch gesicherter Diagnose einen erhöhten Plasma-Lysozymwert. Es wurde keine Korrelation zwischen der Monocytenzahl im peripheren Blut und dem Lysozymspiegel offensichtlich. Ähnlich fand sich keine Korrelation zwischen Lysozym und Aktivitätszustand, Dauer, Behandlungserfolg und Stadium des Krankheitsprozesses.

Für die Differentialdiagnose des M. Boeck von der Lungentuberkulose ist Lysozym demnach wenig geeignet.

Lysozym in der Hämatologie:

Ossermann entdeckte 1966 (14) große Mengen eines ungewöhnlichen, kationischen, basischen Proteins im Urin von Patienten mit monocytärer und myelomonocytärer Leukämie. Er identifizierte das unbekannte Protein als Lysozym, das bei Monocytenleukämie in excessivem Ausmaß vorhanden ist. Ein Abweichen der Lysozymaktivität im Serum bei hämatologischen Störungen, meist im Sinne einer Vermehrung, war aber bereits bekannt (67). Bei Überschreiten eines Grenzwertes im Plasma kommt es zu einer Lysozymurie größeren Ausmaßes. Nach der Entdeckung des Lysozyms im Urin wurde die Lysozymbestimmung intensiv auf ihren Wert für Differentialdiagnose, Therapie und Verlaufskontrolle maligner hämatologischer Proliferationen untersucht.

Malmquist (68) bestimmte mit der von ihm entwickelten Immunelektrophorese-Technik "Rocket-Elektrophorese" Lysozym bei Leukämien und Polycythämia vera (68). In Seren mit monocytoider leukämischer Zellmorphologie fanden sich starke Anstiege des Serumlysozyms, jedoch konnte durch Überlappen der Werte keine klare Unterscheidung zwischen Monocytenleukämie und anderen akuten Leukämien aufgrund des Plasmalysozymspiegels getroffen werden. Bei Polycythämia vera ist das Serumlysozym im Gegensatz zu reaktiven Erythrocytosen leicht erhöht. Bei der diagnostischen Auswertung des Plasmalysozyms ist der Nierenstatus der Patienten zu berücksichtigen, da

Lysozym bei proximalen Tubulusschäden verlorengeht. Tischendorf (60) konnte diese Ergebnisse bestätigen. Eine excessive Erhöhung des Lysozyms im Plasma tritt vor allem bei chronisch myeloischer Leukämie und Monocytenleukämie auf, wobei die Monocytenleukämie mit Lysozymurie einhergeht. Neoplastische Proliferationen des lymphopoetischen Systems zeichnen sich durch eine erniedrigte Lysozymaktivität aus. Dies ist verständlich, da in der lymphatischen Zellreihe kein Lysozym nachgewiesen werden konnte. In Tischendorf's Untersuchungen spiegelt der Lysozymgehalt des Plasmas exakt das Verhalten des leukämischen Zustandes wieder. Mit Remissionen und Besserung des klinischen Bildes gehen im Urin und im Serum die Aktivitäten zum Normbereich zurück. Rezidive lassen sich bereits frühzeitig im Auftreten von Lysozymurie erkennen. Auch in den Blutzellen per se ist Lysozym erhöht. Lysozymaktivitätsmessungen von weißen Blutzelllysaten Leukämiekranker zeigten erhöhte Werte, sowohl bei akuten myeloischen als auch bei chronisch myeloischen Leukämien. In Leukozytenlysaten lymphatisch leukämisch Kranker finden sich deutlich Werte unter dem Normalpegel (60). Es ist in diesem Zusammenhang noch unklar, ob Lysozym beim Tod der Zellen en bloc freigesetzt wird oder ob es kontinuierlich während der Lebensdauer der Granulocyten ans Plasma abgegeben wird. Im ersteren Falle würde der Lysozymspiegel den Granulocyten Turnover wiedergeben, im letzteren den totalen Granulocytenpool im Organismus. Ähnliche Ergebnisse fanden Moe et al. (69) bei Kindern: Extrem hohe Serumaktivitäten bei Monocytenleukämie. Im Gegensatz zu den meisten anderen Autoren (60, 68, 74)

stellte er bei akuten myeloproliferativen Systemerkrankungen jedoch einen Lysozymaktivitätsabfall im Serum fest, wie es bei lymphatischen Leukämien der Fall ist. Ein Rezidiv eines lymphatischen Schubes kündigt sich bereits frühzeitig durch ein diagnostisch erfaßbares Absinken des Lysozyms auf subnormale Werte an. Bei Remissionen erfolgt eine Normalisierung. Currie (71) veröffentlichte 1976 eine prognostische Auswertung der Lysozymaktivität im Serum: Von 19 Patienten mit akuter myeloischer Leukämie mit Lysozym über 15 µg/ml sprach keiner auf Chemotherapie an.

Von 10 Patienten mit gleicher Störung und Lysozymwerten über 85 µg/ml konnte bei allen chemotherapeutisch eine Remission erreicht werden.

Von 59 Patienten mit Lysozymspiegeln zwischen 15 und 85 µg/ml antworteten 39 positiv auf die Therapie. Currie kam damit zu der Ansicht, daß ein Lysozymspiegel unter 15 µg/ml bei akuter myeloischer Leukämie eine Therapie von vorneherein aussichtslos macht (71). Dieser Zusammenhang zwischen Lysozym und akuter myeloischer Leukämie wird von einigen Autoren, wegen der geringen Anzahl untersuchter Patienten und der bekanntlich erheblichen Abweichungen bei den Bestimmungsverfahren, bezweifelt (72, 73).

Eine Forschungsreihe von Labeledzki et al. (74) ergab, vermindertes Serumlysozym bei Panmyelophthisen sowie bei akuter lymphatischer Leukämie. Signifikant gesteigerte Aktivitäten fanden sich bei myeloischen, monocytären und myelomonocytärer Proliferationen. Bei reiner Monocytenleukose konnte konstant eine Lysozymurie nachgewiesen wer-

den, wenn der Serumspiegel 50 $\mu\text{g/ml}$ überstieg. Im direkten Lysozymnachweis in den Zellen waren nahezu 100% der leukämisch alterierten Monocyten lysozympositiv. Die Zellen der chronischen und unreifzelligen lymphocytären Leukosen enthielten kein Lysozym, die unreifzelligen myeloischen Leukosen zum größten Teil keines (74).

Bratlid et al. (75) berichtete ebenfalls über reduzierte Lysozymspiegel bei kindlicher akuter lymphatischer Leukämie, wobei sich Rezidive nach Remissionen durch eine neuerliche pathologische Lysozymaktivität ankündigten. Bei akuten myeloischen Störungen kam Bratlid im Gegensatz zu anderen Autoren (68, 60, 71, 76) ausschließlich zu normalen Lysozymaktivitäten.

Anscheinend ist der Lysozymgehalt der leukämischen Blutzelle vom Reifungsgrad der Zelle abhängig (76). Mit zunehmender Unreife sinkt der Lysozymanteil in der Zelle. Eine klare Unterscheidung zwischen lymphatischen und nicht-lymphatischen Leukämieformen kann durch Enzymbestimmung in Leukocytenlysaten getroffen werden. Im unauffälligen Lysaten liegt der Lysozymgehalt bei etwa $2,5 \mu\text{g}/10^6$ Zellen. Einige Befunde (Briggs et al. (77)) sprechen für eine Freisetzung des Lysozyms aus den Zellen erst nach einer Zellbeschädigung, so daß das Serumlysozym die Umsetzungsrate der Granulocyten darstellt (Jaworkowsky 70).

Eine Reduktion des intraneutrophilen Lysozyms konnte Karle et al. (78) bei Patienten mit Multiplen Myelom finden, das sich nach intensiver Chemotherapie normalisiert. Im Gegensatz dazu fand Eknath et al. (79) bei Multiplen Myelom-Patienten nur normale Serumlysozymspiegel.

Die Bestimmung von Lysozym im Serum und in Leukocytenlysaten ist zur Differentialdiagnose zwischen lymphatischen und myeloischen Leukämien anwendbar. Außerdem bietet es eine Kontrollmöglichkeit für die Effizienz der Therapie und des Verlaufes der Krankheit. Das Auftreten pathologischer Werte nach Remissionen kann möglicherweise als Früherkennung eines Rezidives angesehen werden. Monocytäre Leukämien gehen in der Regel mit schweren Lysozymurien einher.

Zur Differentialdiagnostik proliferativer Störungen innerhalb einer Zellreihe ist die Lysozymbestimmung nicht geeignet.

Lysozym bei entzündlichen Darmkrankheiten

In der Diagnose der Darmerkrankungen wirft die Differenzierung zwischen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa durch Überlappen ihrer klinischen, radiologischen und histologischen Merkmale oft Schwierigkeiten auf. Es handelt sich jedoch bei beiden Erkrankungen klinisch und pathologisch um zwei verschiedene, einheitliche Krankheitsbilder.

Eine Untersuchung von Falchuk et al. (80) stellte fest, daß durch Serumlysozymbestimmung die Crohn'sche Erkrankung eindeutig von anderen entzündlichen Darmerkrankungen abgegrenzt werden konnte:

	Lysozym im Serum
M. Crohn	$26,3 \pm 1,4 \mu\text{g/ml}$
C. ulcerosa	$9,3 \pm 0,6 \mu\text{g/ml}$
Kontrolle	$8,8 \pm 0,3 \mu\text{g/ml}$

Die Ergebnisse zeigen eine klare Unterscheidungsmöglichkeit zwischen M. Crohn und Colitis ulcerosa. Im Zusammenhang mit dem Aktivitätsstadium ist der Serumlysozym-

spiegel diesem direkt korreliert (Falchuk et al. (51)). Patienten mit schweren bzw. aktiven M. Crohn tendieren zu höheren Lysozymwerten als Fälle mit milden Verlauf bzw. inaktiven Stadien. In Längsschnittstudien stieg das Serumlysozym mit Exacerbation der Krankheit an und fiel analog mit klinischer Besserung wieder ab.

Peeters et al. (81) fand keine unterschiedlichen Lysozymkonzentrationen bei M. Crohn, Colitis ulcerosa und gesunden Personen. Mallas et al. (82) stellten eine signifikante Erhöhung bei Morbus Crohn fest, die wegen Überlappen mit den Normalwerten diagnostisch nicht verwertbar waren. Es konnten jedoch Zusammenhänge der Aktivität des M. Crohn mit dem Lysozymspiegel festgestellt werden.

Weder eine Beziehung zwischen Aktivität der Krankheit mit Lysozym noch einen brauchbaren Unterschied zwischen Gesunden und M. Crohn Kranken ermittelten Nugent et al. (49). Eine starke Lysozymerhöhung spricht jedoch mehr für einen M. Crohn als für Colitis ulcerosa (83). Röllinghoff (84) berichtet von keinen signifikanten Lysozymdifferenzen bei Kollektivuntersuchungen in Fällen M. Crohn bzw. C. ulcerosa von gesunden Personen. Ein Zusammenhang mit der Krankheitsaktivität konnte nicht erkannt werden. Eventuell besteht eine Beziehung zwischen der lokalen Ausdehnung des M. Crohn und der Lysozymkonzentration im Serum.

Mit strikt standardisierten Bestimmungsmethoden fand Pruzanski et al. (85) einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen gesunden und M. Crohn-Patienten, der jedoch durch Überlappung nicht auswertbar ist. Im Gegensatz zu Falchuk (51) und Mallas (82) berichtet er nicht von einem Zusammenhang Lysozym - M. Crohnaktivität sondern von

einer Beziehung Lysozym-Aktivität der Colitis ulcerosa. Keinerlei Korrespondenz zwischen Serumlysozym und M. Crohn bzw. C. ulcerosa stellten Manier et al. fest (86).

Bei Untersuchungen des Lysozymgehaltes im neutrophilen Granulocyten war die Enzymaktivität in Fällen Colitis ulcerosa signifikant vermindert, M. Crohn-Kranke zeigten normale Werte (Koldkjaer et al. (87)). Entsprechend fand sich bei C. ulcerosa ein erhöhter, Plasmalysozyspiegel gegenüber M. Crohn-Patienten und Gesunden, genau das Gegenteil der Ergebnisse von Falchuk (80).

Die angeführten Literaturstellen lassen erkennen, daß die Ansichten sehr unterschiedlich sind. Zur Differentialdiagnose M. Crohn und C. ulcerosa ist die Lysozymbestimmung im Plasma wenig geeignet. Es spricht jedoch eine massiv gesteigerte Lysozymaktivität eher für M. Crohn als für C. ulcerosa. Eine derart klare Unterscheidung wie sie Falchuk (80, 51) gefunden hatte konnte nicht nachvollzogen werden. Eine Erklärung der Abweichungen der einzelnen Ergebnisse voneinander ist unter Umständen in den Bestimmungsmethoden zu suchen. Alle Resultate wurden mit photometrischen oder Lysoplate-Methoden erhalten, die per se mehr oder weniger ungenau sind. Eine Klärung der Diskrepanzen wäre durch Ermittlung der Lysozymaktivitäten mittels standardisierter immunochemischer Verfahren zu erwarten.

Lysozym im Serum bei hämatologischen Störungen

Ref.:	Methode	Standard	Kontrolle	AML	CML	MoML/MoL	ALL	CLL	PV
Malmquist (68)	Immunelektrophorese	Human-LZM	1 - 5 µg/ml	N/t-††	†-††	†††	-	N/t	†
Tischendorf (60)	Lysoplate	Human LZM	5, 2 - 9, 4 "	N/t-††	††-†††	††-†††	†-††	N/t	-
Moe (69)	Lysoplate	HEW-LZM	62-400 "	N	-	†††	N/t-††	-	-
Currie (71)	Photometer	HEW-LZM	5, 1 - 9, 7 "	N/t-†††	N/t-††	-	-	-	-
Labeledzki (74)	Photometer	HEW-LZM	4, 9 - 8, 7 "	†-††	N/t-††	††-†††	N/t	t/N/t	-
Bratlid (75)	Photometer	HEW-LZM	2, 5 - 14 "	N	-	†††	†††	-	-
HEW-LZM :	Hühnereiweiß-Lysozym			AML =	akute myeloische Leukämie				
N :	normal			CML =	chronisch myeloische Leukämie				
† :	mäßig erhöht			MoML =	myelomonocytäre Leukämie				
†† :	beträchtlich erhöht			MoL =	monocytäre Leukämie				
††† :	sehr stark erhöht			ALL =	akute lymphatische Leukämie				
- :	keine Angaben			CLL =	chronisch lymphatische Leukämie				
				PV =	Polycytämia vera				

Lysozym im Serum inflammatorischer Darmerkrankungen

Ref.:	Methode	C. ulcerosa	M. Crohn	andere entzündliche Darmkrankheiten	Kontrolle
Falchuk (80)	Lysoplate	N		N	8,8 - 0,4 µg/ml
Peeters (81)	Photometer	N	N	-	17,5 - 3,5 "
Mallas (82)	Photometer	N/↑	N/↑	N/↑	11,5 - 2,8 "
Nugent (49)	Photometer	N	N/↑	-	7 - 2 "
Dobbius (83)	Photometer	N/↑	N/↑	-	8 - 14 "
Röllinghoff (84)	Lysoplate	-	N	-	8,4 - 1,8 "
Pruzanski (85)	Lysoplate und Photometer	N	N/↑	-	7,0 - 1,2 "
Manier (86)	Lysoplate/Photo- meter/Kommer- zielles Assay	N	N	-	-
Koldkjaer (87)	Photometer	↑	N/↑	N/↑	10,1 - 2 "

6.

ZUSAMMENFASSUNG

=====

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war zu untersuchen, ob Lysozym, das von verschiedenen Patienten mit myeloproliferativen Erkrankungen im Urin ausgeschieden wird, immunologisch identisch ist. Falls dieses Lysozym immunologisch identisch ist, d.h. von einer Ursprungsquelle kommt, könnte zur Bestimmung der Ausscheidung von Lysozym eine immunchemische Bestimmungsmethode herangezogen werden. Diese wäre genauer und empfindlicher als die bisher eingesetzten enzymatischen Bestimmungsmethoden.

Lysozym im Urin ist ein Marker für eine Schädigung des proximalen Tubulusapparates der Niere bzw. des Rückresorptionsmechanismus. Nach Nierentransplantationen ist das Ansteigen des Lysozyms im Urin ein Indikator für das baldige Absterben des Transplantates.

Durch Lysozym-Bestimmungen im Plasma lassen sich myeloische und lymphatische Leukämien voneinander unterscheiden. Lysozym-Bestimmung im Plasma wäre daher zur Verlaufskontrolle und zur Früherkennung von Rezidiven geeignet.

Von drei Patienten mit monocytärer Leukämie wurden die Urine getrennt gesammelt und jeweils das Lysozym isoliert. Die Reinigung des Proteins erfolgte in vier Stufen durch Ionenaustauschchromatographie. Jeder Reinigungsschritt wurde analytisch mit der Polyacrylamidelektrophorese überprüft. Gegen eines der gereinigten Lysozyme wurde ein monospezifisches Antiserum von Kaninchen gewonnen. Mit diesem Antiserum wurden die Lysozyme in der gereinigten

Form wie im noch vorhandenen Harn immunologisch miteinander verglichen. Drei verschiedene Techniken wurden dabei eingesetzt, die Ouchterlony Doppelimmundiffusion, die Immunelektrophorese nach Scheidegger, die Immunelektrophorese nach Grabar-Williams. Mit keiner dieser Untersuchungstechniken konnte immunologisch ein Unterschied zwischen den im Urin ausgeschiedenen Lysozyme festgestellt werden.

7.

LITERATURVERZEICHNISS

=====

1. Fleming, A., (1922)
Proc. Roy. Soc. London B 93 306
2. Meyer, K., Hahnel, E., Steinberg, A., (1946)
J. Biol.Chem. 163 733
3. Meyer, K., Thompson, R., Palmer, J.W., (1936)
J. Biol. Chem. 113 303
4. Berger, L.R., Weiser, R.S., (1959)
Biochm. Biophys. Acta 26 517
5. Salton, M.J.R., Ghuysen, J.M., (1959)
Biochem. Biophys. Acta 36 552
6. Strominger, J.L., Tipper, D.J., (1974)
in: "Lysozyme" E.F. Osserman,
Academic Press., New York 1973 p. 169
7. Fleming, A., (1932)
Proc. Roy. Soc. Med. 26 71
8. Labedzki, L., Seché, G., Lorbacher, P., (1977)
Klin.Wschr. 55 677
9. Küffner, K.E., Guenther, H.L., Ray, R.D., (1968)
Calif. Tissue Res. 1 298
10. Spicer, S.S., Franyzer, R., Virella, G., (1977)
Lab. Invest. 36 282
11. Jollès, J., Jauregui-Adell, (1963)
Biochem. Biophys. Acta 78 668
12. Canfield, R.E., Kammermann, S., Soebel, H.J., (1971)
Nature (London) New Biol. 232 16
13. Schindler, M., Mirelmann, D., Sharon, M., (1977)
Biochem. Biophys. Acta 482 380
14. Osserman, E.F., Lawlor, D.P., (1966)
J. Exp. Med. 124 921

15. Murphy, B.J., Kies, W.M., (1960)
Biochem. Biophys. Acta 45 382
16. Maurer, H.R., (1968)
in: Disk-Elektrophorese Walter de Gruyter
Berlin
17. Shugar, D., (1952)
Biochem. Biophys. Acta 8 302
18. Schwich, G., Störiko, K., (1964)
Laboratoriumsblätter med. Diagnostik 5
19. Clausen, J., (1969)
in: "Immunochemical Techniques for the Identification
and Estimation of Macromolecules"
North-Holland Publishing Comp.
20. Ouchterlony, O., (1967)
in: "Handbook of Experimental Immunology"
Blackwell Sci. Publ. Oxford a. Edinburgh p. 655
21. Boasson, E.H., (1938)
J. Immunol. 34 281
22. Alderton, G., Ward, W.H., Fevold, A.L., (1945)
J. Biol. Chem. 157 43
23. Alderton, G., Fevold, A.L., (1946)
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 164 1
24. Richard, M., Parry, Jr., (1965)
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 119
25. Wenzel, M., Lenk, H.P., (1962)
Hoppe-Seyler Zeitschr. Phys. Chem. 327 13
26. Kaiser, E., (1953)
Nature (London) 171 607
27. Skarnes, R.C., Watson, D.W., (1955)
J. Bact. 70 110
28. Enchy, W.W., Burruos, S.E., (1972)
Biochem. Med. 6 149

29. Tepper, T., Meijer, S., (1976)
J. Clin. Path. 29 171
30. Peeters, T.L., Vantrappen, G.R., (1977)
Clin. Chim. Acta 74 217
31. Virella, G., Hipp, W.A., (1978)
Clin. Chem. 24 514
32. Greenwald, R.A., Moy, W.W., (1976)
Clin. Chim. Acta 73 299
33. Laurell, C.-B., (1966)
Anal. Biochem. 15 45
34. Laurell, C.-B., (1965)
Anal. Biochem. 10 358
35. Virella, G., (1977)
Clin. Chim. Acta 75 107
36. Banerjee, S.K., Pogolotti, A., Rupley, J.A., (1975)
J. Biol. Chem. 250 8260
37. Noble, R.E., Fudenberg, H.H., (1972)
Enzyme 14 55
38. Borgen, J., Romslo, I., (1977)
Clin. Chem. 23 1599
39. D'Orazio, P., Meyerhoff, M.E., Rechnitz, G.E., (1978)
Anal. Chem. 50 1531
40. Mintz, G., Herbold, D.R., Glaser, L., (1975)
Anal. Biochem. 66 272
41. Otaki, N., Kimura, M., (1975)
Ind. Health 13 23
42. Klass, H.J., Hopkins, J., (1977)
Biochem. Med. 18 52
43. Johnston, L.S., Neuhaus, F.G., (1978)
Anal. Biochem. 85 56
44. Johansson, B.G., Malmquist, J., (1971)
Scand. J. clin. Lab. Invest. 27 255

45. Canfield, R.E., Collins, J.C., Sobel, J.H., (1974)
in: "Lysozyme" E.F. Osserman,
Academic Press., New York 1974 p. 63
46. Goudswaard, J., Virella, G., (1977)
Clin. Chem. 23 967
47. Deaton, C.D., Maxwell, K.W., (1976)
Clin. Chem. 22 1465
48. Tischendorf, F.W., Haas, H., Hotz, G., (1978)
Fresenius Ztsch. Anal.Chem. 290 182
49. Nugent, F.W., Mallori, R., (1976)
Gastroenterology 70 1014
50. Manier, J.W., Roberts, R.C., (1977)
Am. J. Gastroenterology 67 245
51. Falchuk, K.R., Perotto, J.L., (1975)
Gastroenterology 69 893
52. Belaiche, J., (1976)
Gastroenterology 70 683
53. Röllinghoff, J.W., Brandes, H., (1977)
Klin.Wschr. 55 225
54. El-Kathib, O.S., Lebwohl, O., (1978)
Dig. Dis. 23 297
55. Crowle, A.J., (1973)
in: "Immunodiffusion" Academic Press.,
New York 1973 p. 44
56. Noble, R.E., Fudenberg, (1973)
Enzyme 14 55
57. Hansen, N.E., Korle, H.
in: "Lysozyme" E.F. Osserman
Academic Press., New York 1974 p. 307
58. Kuettner, E.K., Guenther, H.L., (1967)
Calcified Tissue Res. 1 268
59. Maach, T., Sigulem, D.,
in: "Lysozyme" E.F. Osserman
Academic Press., New York 1974 p. 321

60. Tischendorf, F.W., (1975)
Laborblätter f. med. Diagn. 25 70
61. Tischendorf, F.W., Ledderose, G., (1972)
Nature 235 274
62. Horpacsy, G., Zinsmeyer, J., (1978)
Clin. Chem. 24 74
63. Kerby, G.P., Chaudhuri, S.N., (1953)
J. Lab. Clin. Med. 41 632
64. Silverstein, E., Friedland, J., (1977)
Am. J. Clin. Pathol. 68 219
65. Klockars, M., Pettersson, T., (1976)
British Med. J. 1 (6022) 1381
66. Cummiskey, J.M., Melinn, M., (1978)
Irish J. Med. Sc. 147 108
67. Jollès, P., Sternberg, M., (1965)
Israel. J. Med. Sc. 1 445
68. Malmquist, J., (1972)
Scand. J. Haemat. 2 258
69. Moe, P.J., Haneberg, B., (1975)
Acta Paed. Scand. 64 830
70. Jaworkowsky, L., Grant, H., (1977)
Folia Haematol. Leipzig 104 11
71. Currie, G., (1976)
Lancet 1 (7964) 835
72. McCarthy, D., Fitzgerald, G., (1976)
Lancet 1 (7968) 1075
73. Mir, M.A., (1976)
Lancet 1 (7968) 1075
74. Labedzki, L., Seché, G., (1977)
Klin. Wschr. 55 677
75. Bratlid, D., Moe, J., (1978)
Eur. J. Pediatr. 127 263

76. Böhm, H.P., Tischendorf, F.W., (1978)
Klin. Wschr. 56 61
77. Briggs, R.S., Perillie, P.E., (1966)
J. Histochem. Cytochem. 14 167
78. Karle, H., Hansen, N.E., (1976)
Scand. J. Haematol. 17 62
79. Eknath, A., Brokk, D. and J. (1977)
J. Lab. Clin. Med. 90 899
80. Falchuk, K.R., Perotto, J.L., (1975)
N. Engl. J. Med. 292 395
81. Peeters, T.L., (1975)
N. Engl. J. Med. 292 1349
82. Mallas, E., Terry, J.M., (1976)
J.Clin. Pathol. 29 598
83. Dobbins, J.W., Binder, H.J., (1976)
Gastroentology 70 469
84. Röllinghoff, W., Tischendorf, F.W., (1976)
Verhandl. deutsch. Gesellsch. Inn. Med. 1 919
85. Pruzanski, W., Marcon, N., (1977)
Dig. Dis. 22 995
86. Manier, J.W., Roberts, R.C., (1977)
Am. J. Gastroent. 67 245
87. Koldkjaer, O., Klitgaard, N.A., (1977)
Scand. J. Gastroent. 12 135

An dieser Stelle möchte ich meinen Dank aussprechen Herrn Professor Dr. med. W. Kersten für die freundliche Überlassung des Themas.

Herrn Dr. rer. nat. Hans-Jürgen Aschoff für die Einarbeitung in Literatur und Methoden.

Allen Mitarbeitern des Instituts danke ich für Anregungen und freundliche Unterstützung.

Herrn Professor Geyer, Universität Marburg, sei herzlichst gedankt für die Überlassung der Antiseren.

L e b e n s l a u f

=====

Am 1.8.1952 wurde ich als viertes Kind der Eheleute Konrad und Auguste Hofmann, geborene Wendler, in Nürnberg geboren. Von 1958 bis 1964 besuchte ich die Volksschule in Nürnberg-Laufamholz, anschließend trat ich in das Peter-Fischer-Gymnasium ein.

Von 1968 bis 1970 leistete ich ein zweijähriges Industriepraktikum bei der Firma Sandoz AG in Nürnberg ab. Anschließend besuchte ich die Fachhochschule in Nürnberg, wo ich im Februar 1974 die Abschlußprüfung im Fach Chemieingenieurwesen ablegte.

Bis zum Beginn des Medizinstudiums im Sommersemester 1975 arbeitete ich in Südamerika.

Von 1977 bis Ende 1979 fertigte ich am Institut für Physiologische Chemie der Universität Erlangen die vorliegende Arbeit unter Leitung von Professor Dr. med. Walter Kersten an.

Das Studium der Medizin beendete ich mit dem dritten Abschnitt des Staatsexamens im April 1981.

